Aus der Pharmakologischen Abteilung
der Asta-Werke AG, Chemische Fabrik, Brackwede / Westf.
Leiter: Prof. Dr. med. Norbert Brock

Pharmakologische Untersuchungen mit substituierten Oxazaphosporin-2-oxiden

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jochen Kuhlmann
aus Wadersloh

1972

Aus der Pharmakologischen Abteilung
der Asta-Werke AG, Chemische Fabrik, Brackwede/Westf.
Leiter: Prof. Dr. med. Norbert Brock

Pharmakologische Untersuchungen mit substituierten Oxazaphosphorin-2-oxiden

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jochen Kuhlmann
aus Wadersloh

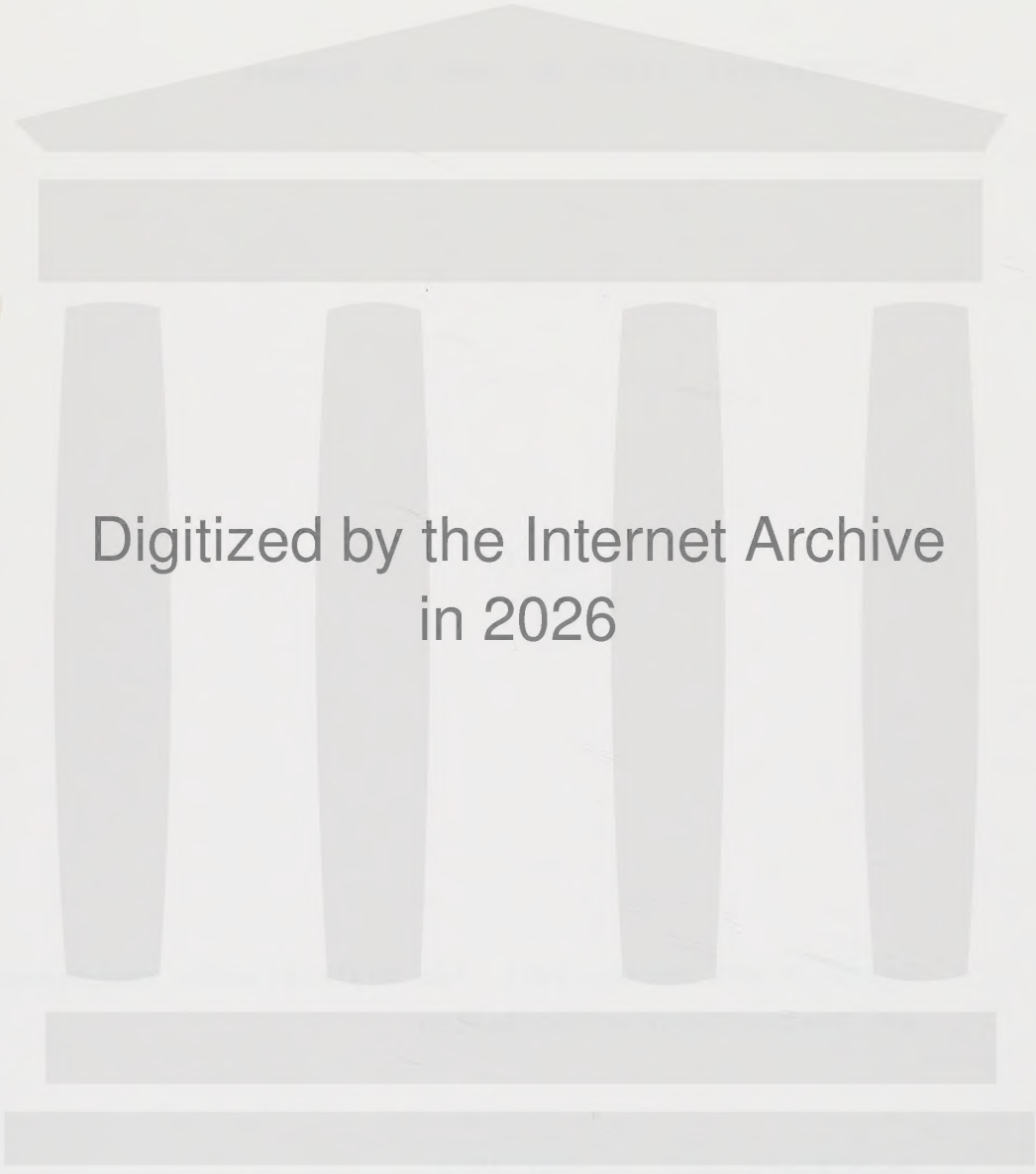
UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. med. H. Herken

Korreferent: Prof. Dr. med. D. Neubert

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 5. Mai 1972


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548902_0003

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Literatur	5
2.	Einleitung	9
3.	Zytostatika als Krebs-Chemotherapeutika	10
3.1	Prinzip Transportform -Wirkform als chemotherapeutisches Prinzip	21
3.2	Anwendung des Prinzips Transportform - Wirkform bei den alkylierenden Substanzen	23
4.	Eigene Problemstellung	27
5.	Auswahlprinzipien und Testmethoden	34
6.	Material und Methodik	36
6.1	Chemische Substanzen	36
6.2	Tiermaterial	37
6.3	Letalitätsbestimmung	37
6.4	Tumor-Screening am Yoshida-Ascites-Sarkom	38
6.41	Versuchstechnik	38
6.5	Hämatologische Untersuchungen an Ratten	38
6.51	Blutgewinnung	39
6.52	Blutzell-Zählung	39
6.53	Blutzell-Differenzierung	41
7.	Ergebnisse des pharmakologischen Screenings	41
7.1	Standardsubstanzen	41
7.2	Allgemeine Strukturprinzipien	43
7.3	Kompletter Austausch der 2-Chloräthyl-Gruppen durch 2-Mesyloxyäthyl- bzw. Alkylsulfonyloxyalkyl-Gruppen im Cyclophosphamid, Trofosfamid und Ifosfamid	45
7.4	Partieller Austausch der funktionellen 2-Chloräthyl-Gruppen gegen die Alkyl-sulfonyloxyalkyl-Gruppe im Trofosfamid	45

Seite

7.5 Partieller Austausch der funktionellen 2-Chloräthyl-Gruppen gegen Alkylsulfonyloxyalkyl-Gruppen im Ifosfamid 48

7.51 Variation der extrazyklischen Alkylsulfonyloxyalkylamino-Gruppe 48

7.52 Alkylsubstitution an den C-Atomen des Oxazaphosphorin-Rings bei extrazyklisch substituierten 2-Mesyloxyäthylamino-Verbindungen 50

7.53 Variation der Mesyloxyalkylgruppe am Oxazaphosphorin-Ring 52

7.6 Bewertung und Diskussion 52

8. Zur pharmakologischen Charakterisierung von ASTA 5122 59

8.1 Chemie 59

8.2 Pharmakologie 60

8.21 Chemische Aktivität in vitro 60

8.22 Zytotoxische Aktivität in vitro 62

8.23 Chemotherapeutische Aktivität in vivo 63

8.231 Chemotherapieversuch am Yoshida-Ascites-Sarkom (Asta) 63

8.232 Chemotherapieversuch an der Leukämie L1210 der Maus 66

8.2321 Versuchstechnik 66

8.2322 Ergebnisse 67

8.24 Leukotoxische Wirkung 68

8.25 Akute Toxizitätsbestimmung 69

8.26 Immunsuppressive Wirksamkeit 71

8.27 Wirkmechanismus 71

8.28 Diskussion 72

9. Zusammenfassung 74

10. Verzeichnis der Generic Names, chem.Bezeichnungen, Handelsnamen und Hersteller der in dieser Arbeit erwähnten Zytostatika 76

11. Lebenslauf 82

1. Literatur

1. ARNOLD, H. u. BOURSEAUX, F., Angew.Chemie 70, 539 (1958)
2. ARNOLD, H., BOURSEAUX, F., BROCK, N., Naturwiss. 45, 64 (1958)
3. ARNOLD, H., BOURSEAUX, F., BROCK, N., Arzneim.-Forsch. 11, 143 (1961)
4. BLUMENBERG, F.-W. u. SCHEEF, W., Med. Welt 20, 2024 (1969)
5. BOCK, H.E., Wien.Klin.Wschr. 72, 331 (1960)
6. BROCK, N., Arzneim.-Forsch. 7, 727 (1957)
7. BROCK, N., Z. Krebsforsch. 62, 9 (1957)
8. BROCK, N., Arzneim.-Forsch. 8, 1 (1958)
9. BROCK, N., Die ärztl. Fortb. 12, 107 (1962)
10. BROCK, N., Therapiew. 21, 1041 (1964)
11. BROCK, N., In: Vth Int. Congress of Chemotherapy, Vol. II/1, Wien.Med.Akad., 1967, S. 155
12. BROCK, N., Vortrag VIIth Int. Congress of Chemotherapy, Prag, 1971
13. BROCK, N. u. GEKS, F.J., Naturwiss. 38, 351 (1951)
14. BROCK, N. u. GEKS, F.J., Arzneim.-Forsch. 1, 63 (1951)
15. BROCK, N., GROSS, R., HOHORST, H.-J., KLEIN, H.O., SCHNEIDER, B., Cancer 27, 1512 (1971)
16. BROCK, N., u. HOHORST, H.-J., Arzneim.-Forsch. 13, 1021 (1963)
17. BROCK, N. u. HOHORST, H.-J., Cancer 20, 900 (1967)
18. BROCK, N. u. SCHNEIDER, B., Arzneim.-Forsch. 11, 1 (1961)
19. BROCK, N. u. WILMANNS, H., Dtsch.med.Wschr. 83, 453 (1958)
20. BROCK, N. u. WILMANNS, H., Therapiew. 10, 6 (1960)

21. Cancer Chemotherapy National Service Center, Cancer Chemother. Rep. 25, 47 (1962)
22. COULTER, W.H., High speed automatic blood cell counter and cell size analyser, Nat. El.Conference, Chicago, 1956
23. COULTER, W.H., Theory of the Coulter Counter Coultronics (Chicago III.)
24. DRINGS, P., ALLNER, R., BROCK, N., BURKERT, H., FISCHER, M., FÖLSCH, E., GERHARTZ, H., GÖTZKY, P., HOPPE, I., KANZLER, G., KLEIN, H.O., MAINZER, K., MARTIN, H., OBRECHT, P., PALME, G., PAULISCH, H., RIEGG, H., SCHUBERT, J.C.F., TRESKE, U., WEISE, W., WILLEMS, D., WILMANNS, H., WITTE, S., WOHLENBERG, H., Dtsch.med.Wschr. 95, 491 (1970)
25. DRUCKREY, H. u. RAABE, S., Klin.Wschr. 30, 882 (1952)
26. DRUCKREY, H., SCHMÄHL, D., DANNEBERG, P., KAISER, K., NIEPER, A., LO, H.W., MECKE jr., R., v.EINEM, J., DISCHLER, W., Arzneim.-Forsch. 6, 539 (1956)
27. DRUCKREY, H., STEINHOFF, D. NAKAYAMA, M., PREUSSMANN, R., ANGER, K., Dtsch.med.Wschr. 88, 651 (1963)
28. DUNHAM, L.J. u. STEWART, H.L., J. of the Nat.Cancer Inst. 13, 1299 (1953)
29. EL-MERZABANI, M.M., and SAKURAI, Y., Gann 56, 589 (1965)
30. EL-MERZABANI, M.M., and SAKURAI, Y., Gann 58, 199 (1967)
31. ELSON, L. A., Ann. N.Y.Acad. Sci. 68, 826 (1958)
32. FRIEDMAN, O.M., SELIGMAN,A.M., J.Amer.Chem.Soc.76, 655 (1954)
33. GERHARTZ, H., Fortschr. d.Med. 81, 607 (1963)
34. GOLDACRE, R.I., LOVELESS, A., ROSS, W.C.J., Nature 163, 667 (1949)
35. GOLDIN, A., SERPICK, A.A., MANTEL, N., Cancer Chemother. Rep. 50, 173 (1966)

36. HADDOW, A. and TIMMIS, G.M., LANCET I, 207 (1953)
37. HEILMEYER, L., Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbehandlung, 2. Freiburger Symposion, Springer, Berlin, 1954, S. 204
38. HOHORST, H.-J., Zum Stoffwechsel der Tumoren In: WILMANNS, H., Chemotherapie maligner Tumoren, Schattauer, Stuttgart, 1959, S. 26
39. HOHORST, H.-J., ZIEMANN, A., BROCK, N., Arzneim.-Forsch. 15, 432 (1965)
40. HOHORST, H.-J., ZIEMANN, A., BROCK, N., Arzneim.-Forsch. 16, 1529 (1966)
41. HOHORST, H.-J., ZIEMANN, A., BROCK, N., Arzneim.-Forsch. 21, 1254 (1971)
42. KUBITSCHEK, H.E., Nature 182, 234 (1958)
43. KUBITSCHEK, H.E., Research 13, 128 (1960)
44. KUBITSCHEK, H.E., Rec.Sci.Instr. 33, 576 (1962)
45. LISS, E. u. PALME, G., Z.f.Krebsf. 66, 196 (1946)
46. LISS, E. u. PALME, G., Arzneim.-Forsch. 13, 1034 (1963)
47. NEVIUS, D.B., Amer.J.clin.Path. 39, 38 (1963)
48. PFEIFFER, G. Z.med.Lab.Techn. 3, 57 (1962)
49. PFEIFFER, G. Nachrichtentechnik 12, 47 (1962)
50. POTEL, J., Arzneim.-Forsch. 21, 900 (1971)
51. ROSS, W.C.J., Ann.N.Y.Acad.Sci. 68, 669 (1958)
52. RUHENSTROTH-BAUER, G. u. ZANG,D., Blut 6, 446 (1960)
53. SAKURAI, Y. and EL-MERZABANI, M.M., Chem.Pharm.Bull. 12, 954 (1964)
54. SANDBERG, J., and GOLDIN, A., Cancer Chemother.Rep. 53, 367 (1969)
55. SCHEEF, W., Vortrag VIIth Congress of Chemotherapy, Prag, 1971
56. SCHMÄHL, D., Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren, Editio Cantor KG, Aulendorf, 1970
57. SCHMÄHL, D. u. DRUCKREY, H., Naturwiss. 43, 199 (1956)

58. SCHMIDT, L.H., FRADKIN, R., SULLIVAN, R., FLOWERS, A., Cancer Chemother. Rep. Suppl. 2, 1965

59. SCHMITZ, G. u. GROSS, R., Med. Welt 18, 985 (1967)

60. SEGAL, S.E., MARBERGER, R., FLOCKS, R.H., J.of Urol. 81, 474 (1959)

61. SELLEI, C. In: VIKOL, J. u. SELLEI, C.: Twenty-five Years in the Fight Against Cancer, Reports of the State Oncological Institute, Academy Press Budapest, 1966

62. SUGIURA, K., SCHMID, F.A., SCHMID, M.M., Cancer Res. 21, 1412 (1961)

63. WEBER, E., Grundriss der Biologischen Statistik, Gustav Fischer, Stuttgart, 1967

64. ZANG, D., Dtsch.med.Wschr. 89, 1710 (1964)

2. Einleitung

Die Heilung des Krebses mit chemischen Mitteln ist eines der dringlichsten, aber zugleich auch eines der schwierigsten Probleme der medizinischen Forschung. Die Arbeiten zur Schaffung einer wirksamen Krebs-Chemotherapie sind durch zwei grundsätzliche Schwierigkeiten belastet. Die erste liegt in der Tatsache, daß die Objekte der Therapie, die Krebszellen, keineswegs gleichartig, sondern von Fall zu Fall extrem verschieden sind: Krebs ist ein Sammelbegriff für die verschiedenartigsten Geschwulstbildungen. Die zweite Schwierigkeit, die die klassische Chemotherapie der Infektionskrankheiten nicht kennt, ist durch die nahe Verwandtschaft der Krebszellen mit den normalen Zellen des Körpers gegeben: Eine hinreichende biochemische Verschiedenheit zwischen beiden Zelltypen, die erst eine spezifische Vernichtung der Erreger ohne Schädigung des Wirtsorganismus erlaubt, ist nicht vorhanden. Etwaige Unterschiede zwischen Tumor- und normaler Zelle betreffen nicht die qualitativen, sondern nur die quantitativen Charakteristika, wie Enzymverteilungs-Muster, Metabolitspiegel und gewisse komplexe Stoffwechselabläufe (Glykolyse) [38]. So ist die Chance, spezifische Chemotherapeutika gegen den Krebs zu finden, von vorn herein viel geringer als bei Infektionskrankheiten.

Das besondere und charakteristische Merkmal der Krebszelle ist ihre Befähigung zu schnellem Wachstum. Hier sollte ein wichtiger Angriffspunkt für eine chemische Krebstherapie liegen; denn Zellen, die sich lebhaft vermehren und einen entsprechend hohen Stoffwechsel haben, sind nicht nur vielen Giften gegenüber wesentlich empfindlicher als ruhende Zellen, sondern auch auf die geeigneten Stoffwechselbausteine, z.B. für die Synthese der lebenswichtigen Nucleinsäuren, in besonderem Maße angewiesen. Demzufolge entwickelte sich in den vergangenen 20 Jahren eine intensive Suche

nach wirksamen Zell- und Stoffwechselgiften, den sogenannten "Zytostatika" [37], die, nimmt man die Zahl der geprüften Verbindungen als Maß, anscheinend erfolgreich verlief.

Um die Bedeutung einer wirksamen Krebs-Chemotherapie voll zu ermessen, muß man sich vergegenwärtigen, daß die klassischen Methoden der Krebsbehandlung - Operation und Bestrahlung - trotz aller technischen Fortschritte kaum mehr als 20 bis 30 Prozent der Krankheitsfälle zu heilen in der Lage sind [20]. Operation und Bestrahlung sind ihrem Wesen nach lokale oder bestenfalls regionale Eingriffe. Ist indessen die Geschwulstbildung nicht oder nicht mehr lokal begrenzt, wie bei Hämoblastosen oder bei bereits eingetretener Metastasierung, kann ein Erfolg nur von der - unter Umständen zusätzlichen - Anwendung einer Therapie mit generalisierter Wirkung erwartet werden. Nach BOCK [5] sind praktisch bereits im Zeitpunkt der Erkennung zwei Drittel aller Karzinome inoperabel, nur bei einem Drittel bestehen echte Heilungschancen. Die Entwicklung einer wirksamen Chemotherapie des Krebses ist damit eine zwingende Notwendigkeit.

3. Zytostatika als Krebs-Chemotherapeutika

Die heute in der Krebs-Chemotherapie bevorzugt verwendeten Substanzen, an deren Entwicklung Forschungskreise vieler Länder beteiligt sind, sind in der Abb. 1 zusammengefaßt. Zwei Hauptgruppen seien hier besonders besprochen.
Die erste Gruppe umfaßt die Antimetaboliten. Ihre zytostatische Wirkung beruht auf der chemischen Ähnlichkeit mit gewissen essentiellen Faktoren und Bausteinen, die für die Synthese der Nucleinsäuren notwendig sind. Die "normalen Bausteine" werden dabei durch diese funktionell unterwertigen Verbindungen verdrängt, wodurch die Zelle zum Absterben verurteilt ist. Wir haben hier eine Parallele zum Wirkmechanismus der Sulfonamide, die mit der für die Bakterien lebensnotwendigen Paraminobenzoesäure um gewisse

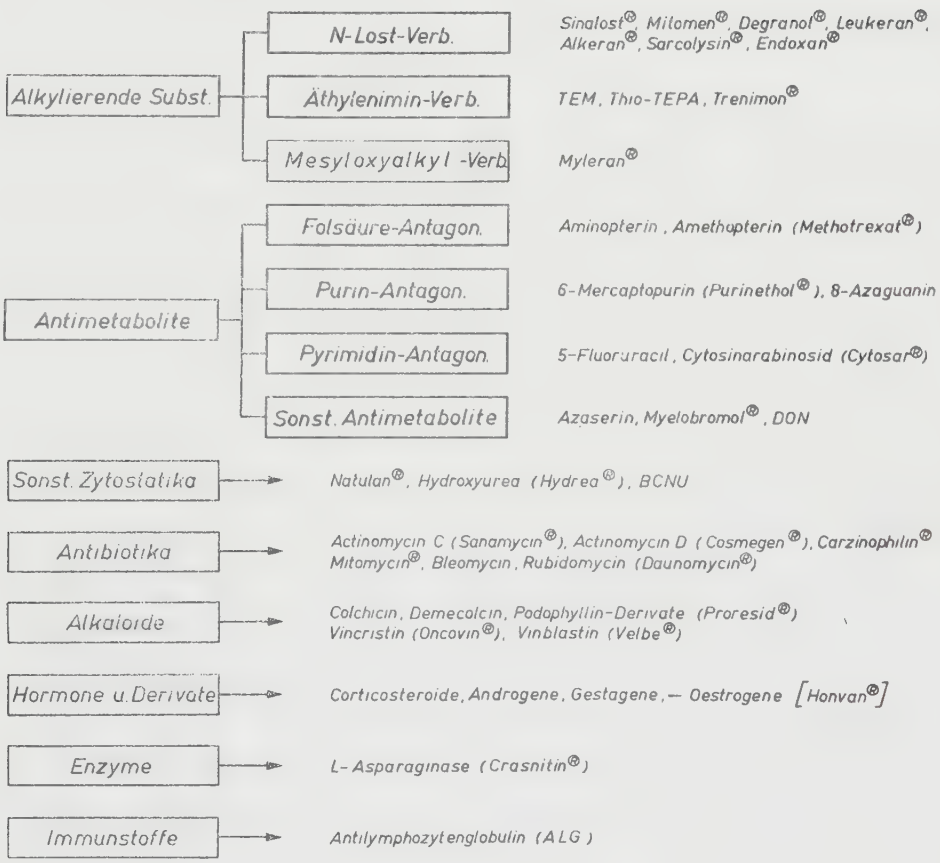


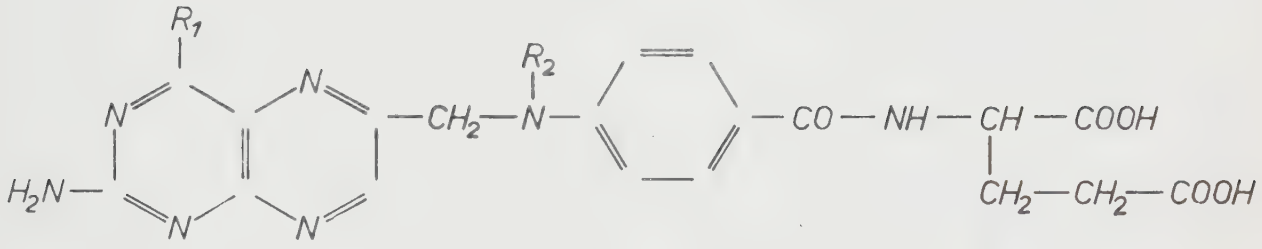
Abb. 1 Pharmakotherapie maligner Tumoren (Übersicht) nach BROCK [9]

funktionell bedeutsame Rezeptoren in den Bakterien konkurrieren. Zu den Präparaten, die auf dieser Grundlage entwickelt wurden, gehören unter anderem die Folsäureantagonisten, Aminopterin und Amethopterin (Abb. 2), sowie die Gegenspieler der Purin- und Pyrimidinbasen, z.B. 6-Mercaptopurin, 5-Fluoruracil (Abb. 3) und Cytosinarabinosid (Abb. 4). Sie spielen vor allem in der Behandlung der akuten Leukosen, insbesondere des Kindesalters, eine bedeutsame Rolle.

Zur zweiten Gruppe gehören die sogenannten alkylierenden Substanzen. Sie wirken als Proliferationsgifte und greifen - wie der Name schon sagt - störend in den Ablauf der Zellteilung ein. Besonders wirksam sind Verbindungen, die an einem geeigneten Grundmolekül wenigstens zwei aktivierbare funktionelle Gruppen tragen. Derartige bifunktionelle Substanzen stehen heute im Mittelpunkt des Interesses, und zwar vornehmlich jene, die im Organismus Ionenformen bilden und alkylierende Eigenschaften besitzen. Nach GOLDACRE, LOVELESS und ROSS [34, 51] liegt der Angriffspunkt der Alkylierung bevorzugt an den Basen von Nucleinsäuren, insbesondere am N-7 des Guanins und am N-1 des Adenins. Als Folge resultiert eine Vernetzung der Nucleinsäuren ("Cross linking"), was zu schwerer Zellschädigung und an den Chromosomen z.B. zu Verklebungen, Brüchen und völliger Destruktion führt.

Diese Auffassung wurde in der letzten Zeit durch Untersuchungen von LISS und PALME [45, 46] gestützt, die unter Cyclophosphamid in vivo eine Hemmung des Einbaus von ^{3}H-Thymidin und ^{32}P ins Gewebe, also eine primäre Hemmung der Nucleinsäuren-Synthese, zeigen konnten.

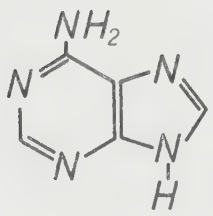
Unter den alkylierenden Substanzen haben sich bisher als besonders brauchbar die 2-Chloräthylamin-, die Äthylenimin- und die Mesyloxyalkyl-Funktion an verschiedenen Grundmolekülen erwiesen (Abb. 5 - 7).



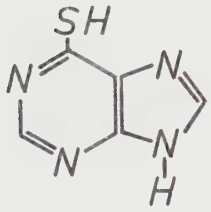
Folsäure:	$R_1 = OH$	$R_2 = H$
Aminopterin:	$R_1 = NH_2$	$R_2 = H$
Amethopterin:	$R_1 = NH_2$	$R_2 = CH_3$

Abb. 2

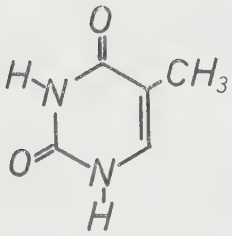
Strukturformeln der Folsäure und ihrer Antagonisten



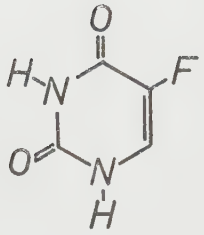
6-Aminopurin
Adenin



6-Mercaptopurin
Purinethol®



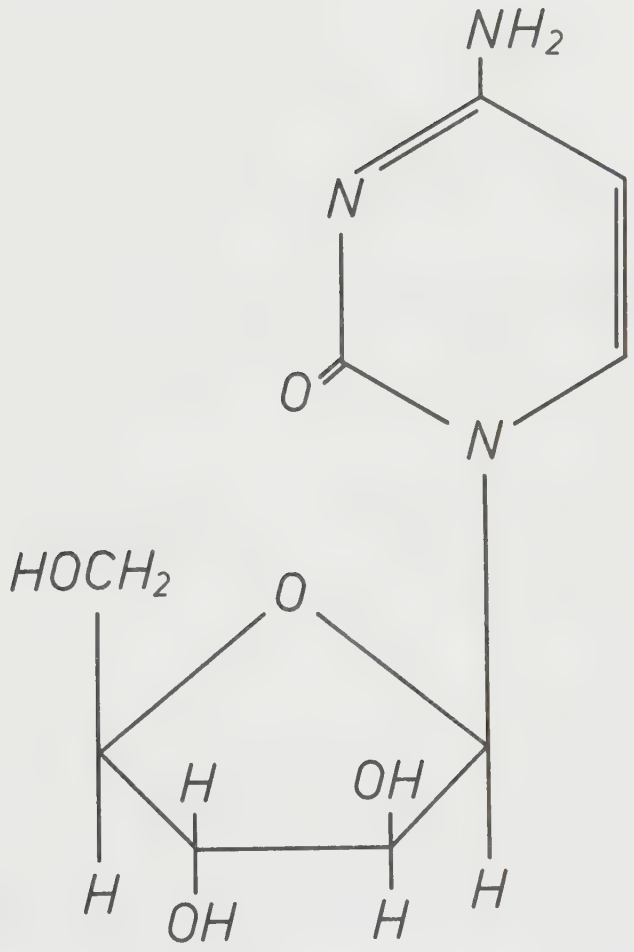
5-Methyluracil
Thymin



5-Fluoruracil

Abb. 3

Strukturformeln von Purin- und Pyrimidin-Antimetaboliten

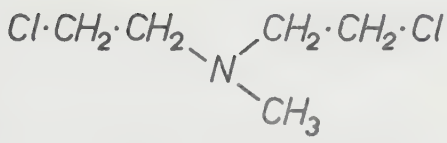


Cytosin-arabinosid

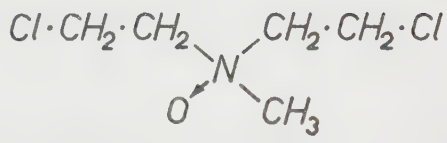
Abb. 4

Strukturformel von Cytosin-arabinosid

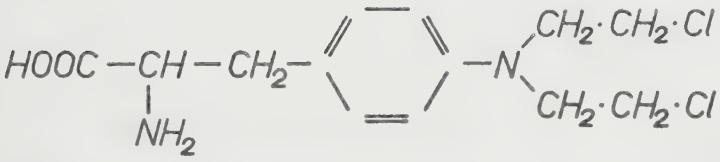
$\geq N-CH_2\cdot CH_2\cdot Cl$ 2-Chloraethylamin-Gruppe



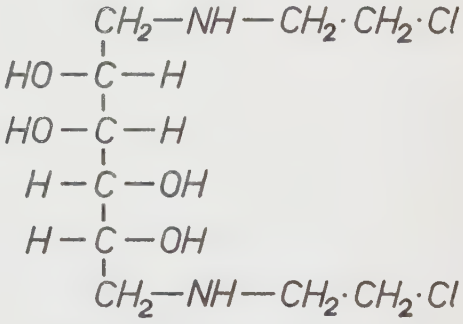
Methyl-bis-(2-chloraethyl)amin
N-Methyl-Lost



Methyl-bis-(2-chloraethyl)aminoxid
N-Oxid-Lost



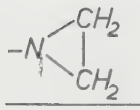
p-Bis-(2-chloraethyl)amino-phenylalanin
Sarkolysin



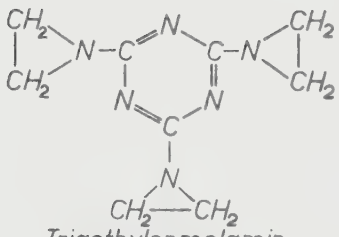
Mannitlost
Degranol

Abb. 5

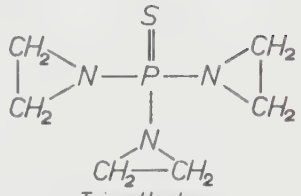
Strukturformeln verschiedener 2-Chloraethyl-Derivate



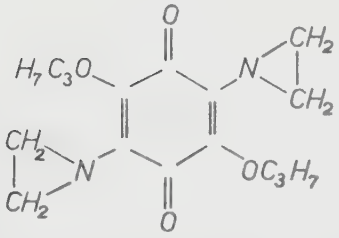
Aethylenimin – Gruppe



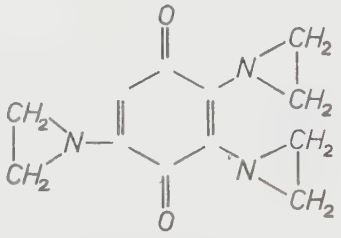
Triaethylenmelamin
TEM



Triaethylen-
thiophosphoramid
Thio-TEPA



2,5-Bis-(n-propoxy)-3,5-bis-(aethylen-
imino)-benzochinon (1,4)
Bayer E39

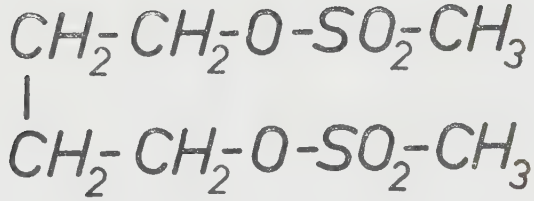


3,5,6-Tris-(aethylenimino)-
benzochinon
Trenimon

Abb. 6

Strukturformeln verschiedener Aethylenimin-Derivate

$-O-SO_2-CH_3$ Mesyloxy-Gruppe



Tetramethylen-bis-(methansulfonat)

(Busulfan)

Abb. 7

Strukturformel von Busulfan

Für die pharmakologische Beurteilung der verschiedenen Wirkgruppen ist es wichtig zu wissen, daß den Äthylenimin- und 2-Chloräthylamin-Verbindungen eine gemeinsame Wirkform zugrundeliegt. In wässriger Lösung entsteht intermediär aus den Lost-Verbindungen durch Abspaltung von Chloridionen und aus den Äthylenimin-Verbindungen durch Ringaufspaltung ein Carbonium-Kation (Abb. 8). Dieses ist chemisch hoch aktiv und in der Lage, mit Wirkgruppen zu reagieren, die beweglichen Wasserstoff besitzen, wie dies z.B. bei den Amino-Gruppen sowie den Carboxyl- und Sulfhydryl-Gruppen der Eiweißkörper und den Phosphat-Gruppen der Nucleinsäuren der Fall ist [51]. Im Falle des Tetramethylen-bis-methansulfonats (Busulfan) wird die Mesyloxy-Gruppe ebenfalls in wässriger Lösung abgespalten, so daß auch ein Carbonium-Ion entsteht. Zum Unterschied zu den Stickstofflost- und Äthylenimin-Verbindungen liegt hier aber eine stickstoff-freie Verbindung vor, eine Tatsache, die für das unterschiedliche pharmakologische Wirkungsbild dieser Substanz sicherlich von wesentlicher Bedeutung ist.

Sowohl die Antimetaboliten als auch die Proliferationsgifte wirken allgemein auf die vermehrenden Zellen. Damit haben sie zwar den Vorteil, ein breites "Wirkungsspektrum" zu besitzen, das die verschiedensten Arten von Krebszellen umfaßt. Sie haben aber zugleich den Nachteil, auch die normalen Proliferationszentren des Wirtsorganismus, wie Blut, Knochenmark, Darmepithelien und Hormondrüsen, zu schädigen. In dieser mangelnden Selektivität der kanzerotoxischen Wirkung liegt die Begrenzung der Zytostatika bei der Anwendung am krebskranken Menschen. Aus diesem Grunde hängt der Fortschritt auf diesem schwierigen Gebiet entscheidend davon ab, ob es gelingt, Substanzen mit höherer Selektivität der Tumorwirkung zu entwickeln und damit eine größere therapeutische Breite, also eine gefahrlosere therapeutische Anwendung, zu erreichen. Dieses Ziel ist nur schwerlich auf rein empirischem Wege, d.h. durch

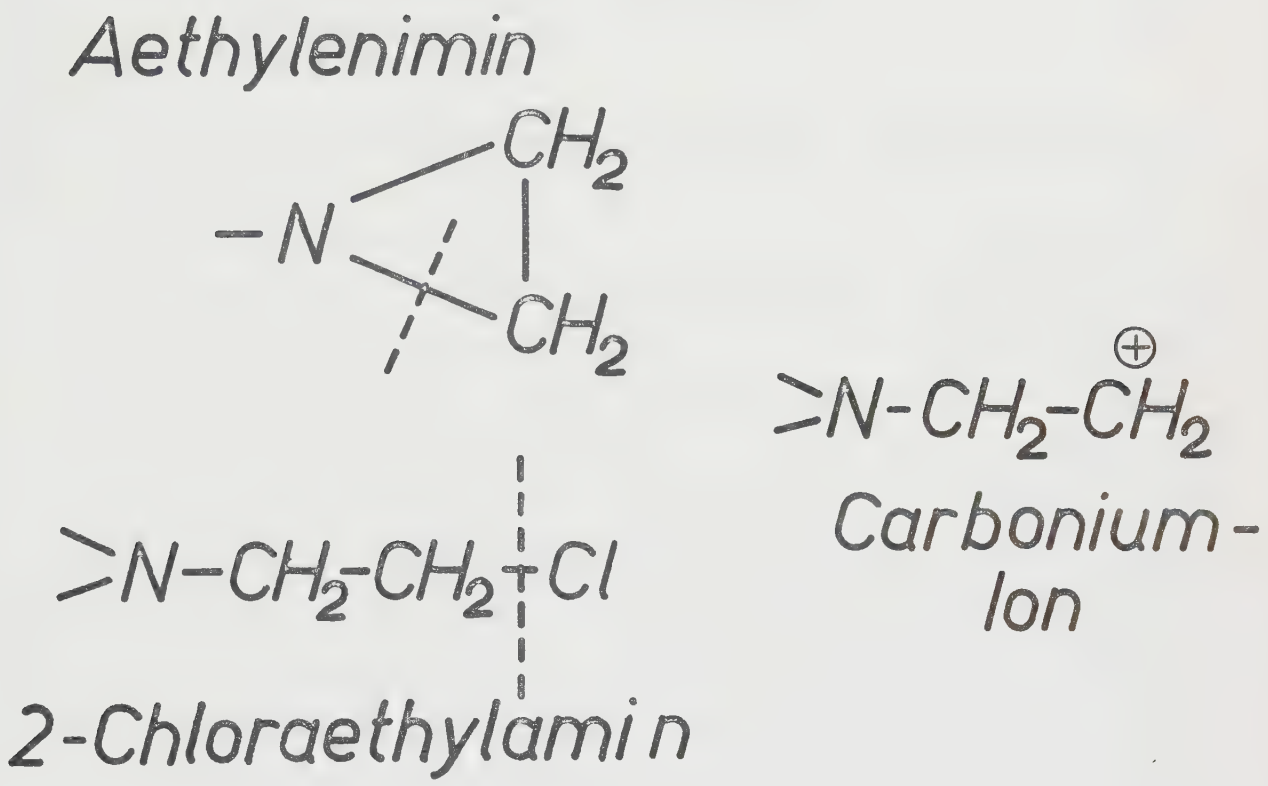


Abb. 8

Bildung eines Carbonium-Kations aus Aethylenimin- bzw. 2-Chloraethylamin-Verbindungen

das Testen beliebiger chemischer Verbindungen, zu erreichen; vielmehr erscheint es, wie insbesondere bei der Therapie mit Antimetaboliten versucht wurde, fruchtbarer und rationeller, die Entwicklung neuer Wirkprinzipien in Kenntnis und enger Anlehnung an die biochemischen Besonderheiten des Tumorgewebes vorzunehmen.

3.1 Prinzip Transportform - Wirkform als chemotherapeutisches Prinzip

Ein neues und aussichtsreiches Wirkprinzip ist das 1952 von DRUCKREY und RAABE [25] vorgeschlagene Prinzip Transportform-Wirkform. Es besteht darin, eine wirksame aktive Substanz durch geeignete chemische Veränderungen in eine inaktive Transportform zu überführen, aus der erst im Organismus, und möglichst bevorzugt am beabsichtigten Wirkungsort, die eigentliche Wirkform freigesetzt wird. Die erste praktisch und klinisch erfolgreiche Anwendung dieses Prinzips erfolgte durch Einführung des Stilboestrol-diphosphats (Honvan®) zur Therapie des Prostatakarzinoms. Durch die im Prostatakrebsgewebe, und zwar sowohl im Primärtumor als auch in den Metastasen, in hoher Aktivität vorhandene saure Phosphatase wird nach DRUCKREY und RAABE im Tumorgewebe aus dem inaktiven Phosphorsäureester das zytostatisch aktive freie Stilboestrol (eine Diphenol-Verbindung) enzymatisch abgespalten. In der Tat konnten - in Bestätigung dieser Ansicht - SEGAL, MARBERGER und FLOCKS [60] nach Applikation von Stilboestroldiphosphat im Prostatagewebe im Vergleich mit anderen Organgeweben eine bis 100fach höhere Konzentration an freiem Stilboestrol während mehrerer Stunden nach der Injektion nachweisen (Abb. 9).

Auch klinisch hat sich das im Honvan realisierte Prinzip - wie zahlreiche Arbeiten des In- und Auslandes bestätigen - (Lit. vergl. [7]), als Fortschritt bewährt. Selbst östrogenresistente Patienten mit Prostatakarzinom lassen sich noch in 30 bis 50 % der Fälle erfolgreich mit Honvan behandeln.

Dosis Stilboestrol-diphosphat [mg]	Freies Stilboestrol in 10 [g] Gewebe		Relative Anhäufung in der Prostata
	Fett oder Muskel [µg]	Prostata [µg]	
50	< 0,025	< 0,025	—
125	< 0,025	0,025	gering
500	< 0,025	0,25	10 ×
1000	0,25	25	100 ×
2000	0,25	25	100 ×

Abb. 9

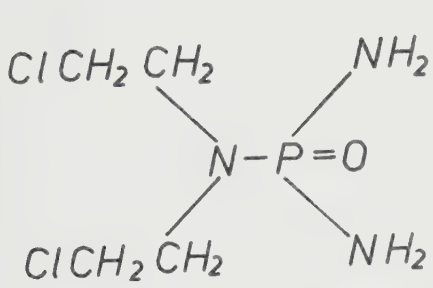
Konzentration an freiem Östrogen in 10 g Gewebe 1 h nach iv.-Gabe von Stilboestrol-diphosphat - in Abhängigkeit von der Dosis - bei Patienten mit Prostatakarzinom

3.2 Anwendung des Prinzips Transportform - Wirkform bei den alkylierenden Substanzen

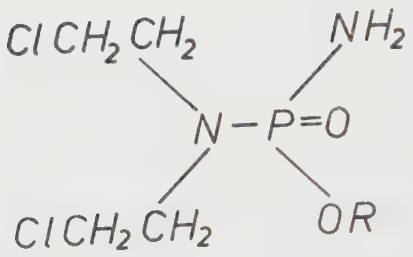
Bei anderen Tumorarten sind die Voraussetzungen für eine selektive Therapie viel ungünstiger als beim Prostatakarzinom, da biochemische Besonderheiten der malignen Zelle hier bislang nicht aufgedeckt werden konnten. Indes fordern Zytostatika vom Typ der Chloräthylamin- bzw. Äthylenimin-Derivate mit ihren starken, aber allgemein zytotoxischen Eigenschaften den Versuch geradezu heraus, das Prinzip Transportform - Wirkform anzuwenden und hierdurch die Selektivität der kanzerotoxischen Wirkung zu erhöhen.

Bei der Anwendung des Prinzips auf die alkylierenden Substanzen zeigten sich die Lost-Verbindungen als besonders geeignet, weil die Wirkung über eine Abspaltung von Chloridionen vor sich geht und so chemisch kontrollierbar ist [6]. Die Reaktivität der funktionellen Gruppen und damit die Geschwindigkeit der Chlorid-Abspaltung ist von der Basizität des Stickstoffes abhängig. Von dieser Stelle aus läßt sich also die Reaktivität der 2-Chloräthyl-Gruppen beeinflussen. Ist diese zu gering, so ist die Substanz therapeutisch meist unwirksam, ist sie dagegen zu groß, so ist die Substanz hoch toxisch. Offenbar existiert ein Optimum, und in zahlreichen Verfahren wurde versucht, sich diesem Optimum zu nähern.

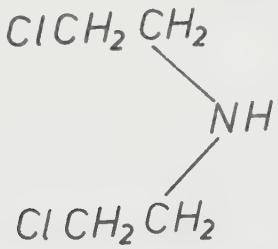
So führten z.B. FRIEDMAN und SELIGMAN [32] die N-Phosphorylierung von Bis-(2-chloräthyl)-amin (III) durch (Abb. 10). Sie gelangten zu N-Lost-Phosphamiden der Strukturen I und II, deren Toxizität im Vergleich zu dem als Ausgangsprodukt verwendeten Bis-(2-chloräthyl)-amin erheblich vermindert war. Mit dem Absinken der Toxizität war allerdings auch die chemotherapeutische Wirksamkeit stark abgesunken [8].



I



II



III

Abb. 10

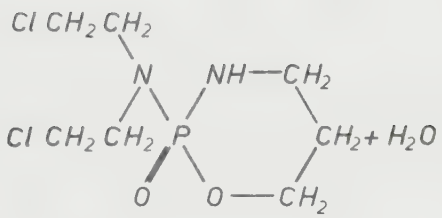
Strukturformeln zweier N-Lost-Phosphamide (I und II) nach FRIEDMAN [32]

Erfolgreich verliefen dagegen die Arbeiten von ARNOLD, BOURSEAUX und BROCK [1, 2] mit der Synthese des Cyclophosphamids, einem zyklischen Phosphamidester des Bis-(2-chloräthyl)-amins (Abb.11). Die Verbindung selbst ist chemisch und pharmakologisch weitgehend inaktiv, im Chemotherapieversuch in vivo gegen zahlreiche experimentelle Tumoren aber hoch aktiv [8].
Die überlegenen chemotherapeutischen Eigenschaften des Cyclophosphamids [9, 19, 20] sind inzwischen vielfach bestätigt und erweitert worden. So schrieben SUGIURA und Mitarbb. [62]: "Among 1000 selected compounds and antibiotics tested against all or portions of the tumor spectrum (33 tumors) cyclophosphamide was the most effective".

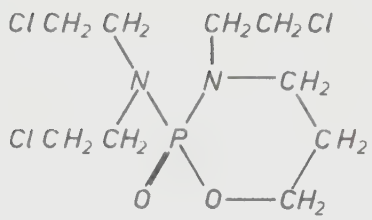
Aus biochemischen Untersuchungen von BROCK und HOHORST [16, 17, 39, 40, 41] geht hervor, daß Cyclophosphamid im Organismus, und zwar bevorzugt in den Lebermikrosomen, in ein oder mehrere aktive Umwandlungsprodukte überführt wird, die ihrerseits im Vergleich zu anderen aktiven Stickstofflost-Verbindungen eine relativ hohe Selektivität der kanzerotoxischen Wirkung besitzen.

Trotz der übereinstimmend festgestellten hohen Wirksamkeit und zugleich guten Verträglichkeit des Cyclophosphamids im Tierexperiment sind die klinischen Ergebnisse, verglichen mit den experimentellen, noch unbefriedigend. Immerhin konnten in den letzten Jahren durch die Erweiterung der pharmakologischen Grundlagen, insbesondere durch das Studium der Dosis-Wirkungs-Beziehung [27] und die Kenntnis der Pharmakokinetik [15] , auch bei der therapeutischen Anwendung am Menschen erhebliche Fortschritte erzielt werden. Die pharmakologisch begründete Stoßtherapie führte in der Klinik zu einer Steigerung der Remissionsrate und zu einer, zumindest temporären, Überwindung chemotherapeutischer Resistenzerscheinungen [4, 55, 59].

Cyclophosphamid



Trofosfamid



Ifosfamid

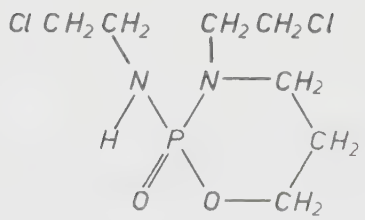


Abb. 11

Strukturformeln von Cyclophosphamid, Trofosfamid und Ifosfamid

In jüngster Zeit wurden von BROCK aus dem gleichen Arbeitskreis zwei neue Verbindungen, Trofosfamid und Ifosfamid, die ebenfalls dem Prinzip Transportform - Wirkform folgen, pharmakologisch charakterisiert [11, 12].
Auf Grund der bisher vorliegenden Ergebnisse der klinischen Prüfung [24, 55] bedeutet ihre Einführung eine Ausweitung der therapeutischen Möglichkeiten. Dabei zeichnete sich Trofosfamid durch hohe orale Verträglichkeit, Ifosfamid durch günstige kumulative Eigenschaften und durch eine im Vergleich zu Cyclophosphamid geringere leukotoxische Wirkung aus. Unter den alkylierenden Substanzen nehmen sie damit eine Spitzenposition ein.

4. Eigene Problemstellung

Die eigenen Arbeiten gehen von Wirkungsunterschieden aus, die sich in der Gruppe der alkylierenden Substanzen bei der pharmakologischen und klinischen Prüfung von Stickstofflost- und Mesyloxyalkyl-Verbindungen ergeben haben. Sie werden deutlich, wenn man das chemotherapeutische Wirkungsspektrum betrachtet, das GERHARTZ [33] auf Grund vorliegender Erfahrungen bei über 1000 Patienten aufgestellt hat (Abb. 12). Für die N-Lost- und Äthylenimin-Verbindungen erkennt man ein breites Indikationsspektrum, das nicht nur die Hämoblastosen, Lymphoblastome und Retikulosen, sondern auch eine ganze Reihe generalisierter epithelialer Geschwülste umfaßt. Busulfan als Hauptvertreter der Mesyloxyalkyl-Verbindungen hat dagegen nur e i n e echte Indikation. Es stellt das Mittel der Wahl bei der chronischen myeloischen Leukämie dar.

Auch im pharmakologischen Wirkungsbild liegen charakteristische Unterschiede vor, die den Aufbau des "Screenings" für die beiden Verbindungstypen unterschiedlich gestalten. Stickstofflost- und Äthylenimin-Verbindungen werden primär an Experimental-Tumoren getestet, an denen sie in Abhängigkeit

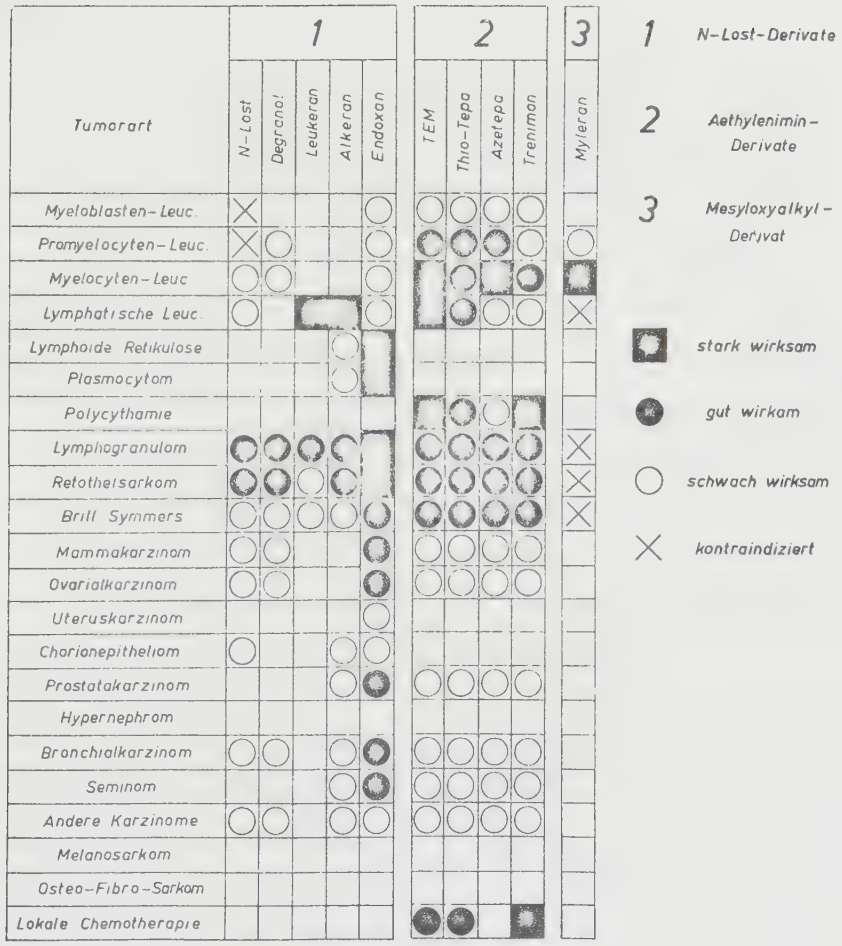


Abb. 12

Wirkungsspektrum alkylierender Zytostatika nach GERHARTZ [33]

von der Dosis zu Wachstumshemmungen und unter Umständen zur Heilung führen. Busulfan ist gegenüber Experimental-Tumoren praktisch wirkungslos und kann so in einem Tumor-Screening nicht erkannt werden [58].

> Die Wirkungslosigkeit von Busulfan gegenüber Experimentaltumoren erschien zunächst überraschend, da der Nachweis einer Wachstumshemmung am Walker-Tumor (CB-Stamm) für HADDOW und TIMMIS [36] einer der Gründe war, die Substanz zur klinischen Prüfung zu übergeben. Die Ergebnisse von HADDOW und TIMMIS waren aber in der Folgezeit nicht reproduzierbar. SCHMIDT u. Mitarbb. [58] geben hierzu folgende Begründung: "The reported activity was not of a high order and the appraisal of effectiveness was made forty-eight hours after the last dose had been administered. So it is easy to overestimate the benefits conferred by this drug".

Charakteristische Wirkungsunterschiede zwischen den Derivaten des Stickstofflosts und Busulfan werden auch im Blutbild deutlich. Im Vordergrund der Busulfan-Wirkung steht die selektiv myelotoxische Wirkkomponente, die zu einer Abnahme der granulierten Leukozyten im Blut bei Konstanz der Lymphozytenwerte führt; die Gesamtzahl der Leukozyten sinkt bei der Ratte erst im toxischen Bereich ab. Bei den Stickstofflost-Verbindungen kommt es dagegen in den ersten Tagen nach der Applikation gleichzeitig zur Abnahme der granulozytären und lymphozytären Elemente und, hierdurch bedingt, auch zu einer Abnahme der Gesamtleukozyten im Blut.
Die Granulozyten erholen sich aber in wenigen Tagen, man beobachtet dann einen bemerkenswerten Anstieg bis zu einer Gesamtzahl, die das 5fache des Normalwertes beträgt. Die höchsten Granulozytenzahlen werden etwa 8 bis 10 Tage

nach Verabfolgung einer Einzeldosis erreicht. Dieser Granulozytenanstieg wird als Reaktion des Knochenmarks auf eine kurzfristige primäre Hemmung aufgefaßt [31] (Abb. 13).

Die Gründe für die besprochenen Wirkungsunterschiede zwischen Verbindungen, die die 2-Chloräthyl- bzw. die Mesyloxyalkyl-Gruppe als funktionelle Gruppe tragen, sind bislang noch ungeklärt. In den letzten Jahren sind einige Substanzen beschrieben worden, bei denen in Abhängigkeit von Änderungen der chemischen Struktur auch das Wirkungsbild sich wandelte, sei es, daß neue Eigenschaften zu den bekannten hinzukamen, sei es, daß ein "Umschlagen" der Wirkung eintrat.

So synthetisierten SAKURAI und EL-MERZABANI [53] - ausgehend von dem Bestreben, wasserlösliche Präparate für eine parenterale Applikation zu erhalten - 2-Mesyloxyäthyl- bzw. 3-Mesyloxypropyl-Verbindungen, von denen zwei Präparate (Nr. 838 und Nr. 864) pharmakologisch eingehend untersucht wurden (Abb.14). Mit Einführung des basischen Stickstoffes blieb zwar die spezifisch myelotoxische Wirkkomponente voll erhalten, im Gesensatz zu Busulfan waren diese Verbindungen aber auch tumorwirksam (Versuche am Yoshida-Sarkom der Ratte und der Leukämie L1210 der Maus [29, 30, 54]).

In den Arbeiten der ungarischen Arbeitsgruppe um VARGHA u. Mitarbb. findet sich ein interessantes Beispiel eines Wirkungsumschlags in der Gruppe der Mesyloxyalkyl-Verbindungen (referiert nach SELLEI [61]). R 37 ("Mannitol-Myleran") besitzt eine seletiv myelotoxische, R 49, die entsprechende Mesyloxyäthylamino-Verbindung (Abb. 15), eine selektiv lymphotoxische Wirkung.

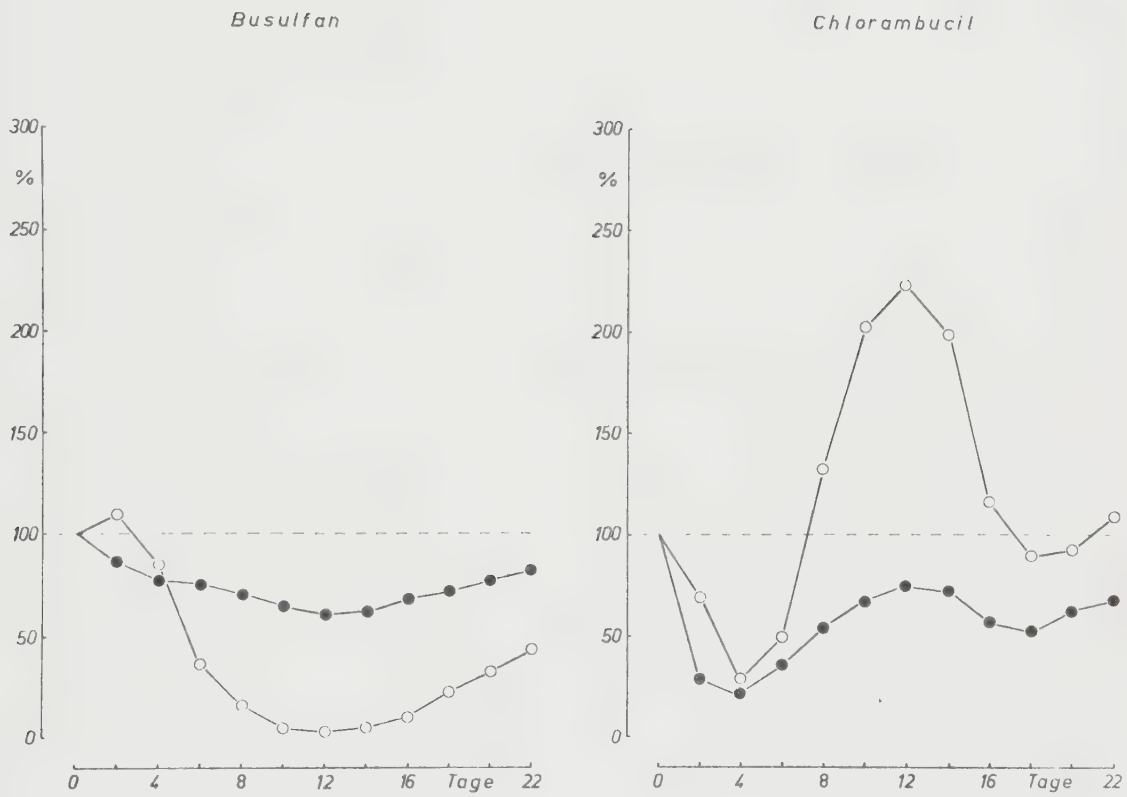


Abb. 13

Verhalten der Granulozyten (○) und Lymphozyten (●)
nach Applikation von Busulfan (15 mg/kg) und
Chlorambucil (12,5 mg/kg)
Ordinate: Prozent der normalen Ausgangswerte
nach ELSON [31]

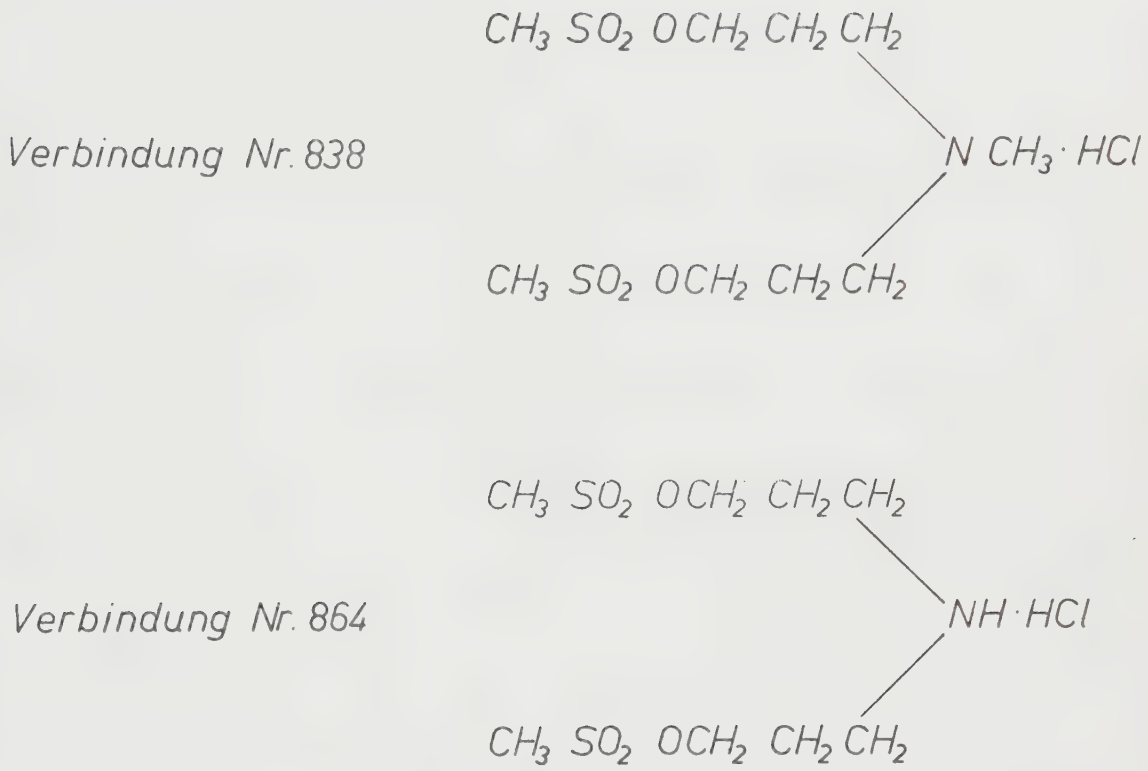
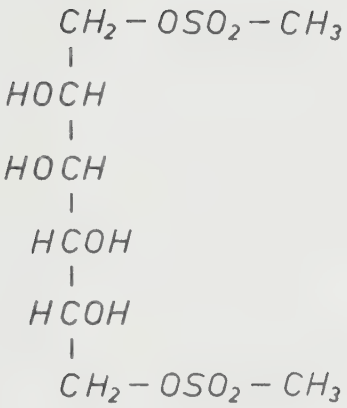


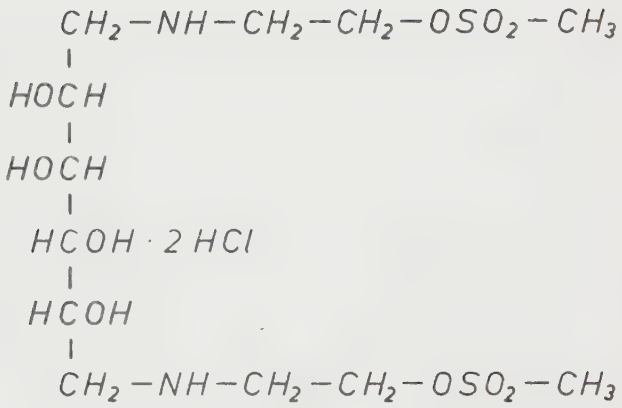
Abb. 14

Mesyloxypropyl-Verbindungen nach SAKURAI [53]



R 37

Mannitol – Myleran



R 49

1,6-β-mesyloxy-aethylamino-1,6-didesoxy-D-mannitol-dihydrochlorid

Abb. 15

Zwei zytostatisch wirksame Zucker-Derivate nach SELLEI [61]

Angesichts der charakteristischen Unterschiede zwischen den 2-Chloräthyl- und den Mesyloxyalkyl-Verbindungen stellte ich mir gemeinsam mit den Wissenschaftlern der Asta-Forschungslaboratorien (ARNOLD, BOURSEAUX und BROCK) die Aufgabe, die 2-Mesyloxyäthyl-Gruppe, oder allgemeiner, die Alkylsulfonyloxyalkyl-Gruppe auf die Strukturen des Cyclophosphamids, des Ifosfamids und des Trofosfamids zu übertragen. Biochemisch interessierte die Frage, ob derartige Verbindungen ebenfalls inaktive Transportformen darstellen und ob sie im Organismus aktiviert und damit pharmakologisch wirksam würden. In der pharmakologischen Prüfung war zu klären, welche Faktoren bzw. funktionelle Gruppen das Wirkungsbild bestimmten: Ob die Verbindungen dem "Busulfan-Typ" folgen würden, oder ob sich der Stickstofflost-Charakter durchsetzen würde. Dabei galt unser besonderes Interesse solchen Verbindungen, die nicht nur granulo- bzw. lymphotoxisch, sondern auch tumorwirksam waren. Es erschien nicht ausgeschlossen, daß derartige Verbindungen klinisch in der Behandlung der verschiedenartigen Hämoblastosen sich bewähren und ein im Vergleich zu Busulfan breiteres Wirkungsspektrum bieten würden.

Aus dieser Zielsetzung heraus war es meine Aufgabe, ein pharmakologisches Screening der synthetisierten Verbindungen durchzuführen und anschließend eine der aussichtsreichsten Verbindungen pharmakologisch näher zu charakterisieren.

5. Auswahlprinzipien und Testmethoden

Als "Screening" bezeichnet man in der angelsächsischen Literatur die Aufgabe, aus einer großen Zahl unbekannter Substanzen die Verbindungen zu ermitteln, für die eine eingehende pharmakologische Prüfung aussichtsreich erscheint. Das Screening ist somit das erste Glied in der langen Kette von Untersuchungen, die ein Pharmakon bis zur endgültigen

klinischen Anerkennung durchlaufen muß. Der besondere Charakter dieser ersten Stufe wird dadurch bestimmt, daß die "aussichtsreichen Substanzen" in der Gesamtzahl nur einen sehr kleinen Bruchteil darstellen. Die Mehrzahl der entwickelten Verbindungen wird bereits im Screening ausgeschieden. Deshalb wird man bemüht sein, den Prüfaufwand dieser ersten Stufe möglichst gering zu halten. Auf der anderen Seite kann aber die Ablehnung einer aussichtsreichen Substanz einen unübersehbaren Verlust bedeuten, so daß es wichtig ist, auch dieses Risiko möglichst klein zu halten. Die Lösung dieser Aufgabe wird erleichtert, wenn die pharmakologischen Gesichtspunkte (z.B. Versuchsanlage, adäquater Modellversuch, Wirkkriterien, Zielsetzung) gebührend berücksichtigt und die Entscheidungen mit Hilfe mathematisch-statistischer Methoden gesichert werden.

Der pharmakotherapeutische Wert einer Verbindung wird durch die Dosis-Wirkungs-Beziehung ihrer nützlichen und schädlichen Wirkkomponenten bestimmt. Aus den Wirkungsgeraden kann als Maß für die Güte einer Substanz der Therapeutische Index und der D 50-Index [14, 18] sowie der Gefahrenkoeffizient [13] ermittelt werden. Ersterer wird ausgedrückt durch das Verhältnis DL 5 zu DC 95, der D 50-Index stellt das Verhältnis der DL 50 zur DC 50 dar und der Gefahrenkoeffizient gibt an, mit welcher toxischen Wirkungswahrscheinlichkeit die kurativ voll wirksame Dosis belastet ist. Diese Definitionen sind für die chemotherapeutische Bewertung allgemein anwendbar. Zur Bestimmung dieser Maßzahlen ist es wichtig, für jede interessierende Wirkkomponente einen klaren und einfachen Test zu besitzen, der in seinen pathophysiologischen Gegebenheiten dem klinischen Geschehen so weit wie möglich angenähert sein soll.

Das Screening der vorliegenden Präparate mußte, entsprechend dem Versuchsziel, die kanzerotoxische, leukotoxische und die letale Wirkkomponente berücksichtigen.

Zur Prüfung der kanzerotoxischen Wirkkomponente stand mir ein chemosensibles Yoshida-Sarkom der Ratte zur Verfügung. Der Tumor wurde 1968 aus Japan übernommen und seither im Pharmakologischen Laboratorium der Asta-Werke an Ratten des Stammes Sprague-Dawley weitergezüchtet. Seine Empfindlichkeit gegenüber alkylierenden Substanzen wurde in diesen Jahren fortlaufend mit Hilfe des in vitro-Inkubationstests [57] mit N-Oxyd-Lost als Standard kontrolliert. Sie war in den vergangenen Jahren praktisch unverändert geblieben. Als Kriterium der kurativen Wirkung diente die endgültige Heilung der Tumoren bei einer Beobachtungszeit von 90 Tagen.

Zur Charakterisierung der leukotoxischen Wirkung wurde der Abfall der Gesamtleukozyten und gleichzeitig getrennt auch der Granulozyten und Lymphozyten im Blut der Versuchstiere quantitativ nach Gabe der einzelnen Substanzen erfaßt. Aus dem Verhalten der Granulo- bzw. Lymphozytenkonzentration im Blut wurden die Präparate dem Busulfan- bzw. dem N-Lost-Reaktionstyp zugeordnet (vergl. Abb. 13).

Die Bestimmung der Letalität wurde an der gleichen Tierart durchgeführt, an der auch die kurativen und leukotoxischen Effekte geprüft wurden. Hierzu wurden alle Tiere erfaßt, die in einem Zeitraum von 14 Tagen nach der Applikation ad exitum kamen. Als Maßzahl wurden aus der Wirkungsgeraden die DL 5 sowie die DL 50 ermittelt.

6.0 Material und Methodik

6.1 Chemische Substanzen

Die Prüfverbindungen wurden im Chemischen Forschungslaboratorium der ASTA-Werke AG, Brackwede, von ARNOLD und BOURSEAUX synthetisiert. In den Tabellen ist die Strukturformel sowie der Schmelzpunkt der einzelnen Derivate (bei kristallinen Substanzen) bzw. der Brechungsindex (bei öligen Substanzen) angegeben. Die chemische Struktur der Verbindungen wurde durch Aufnahme des Infrarot-Spektrums gesichert.

Als Standardsubstanzen dienten Busulfan sowie Verbindung SAKURAI Nr. 864 als Repräsentanten reiner Mesyloxyalkyl-Verbindungen sowie Cyclophosphamid, Ifosfamid und Trofosfamid als Derivate des Stickstofflosts.

Die wasserlöslichen Substanzen wurden in H_2O bzw. in 0,9 % NaCl-Lösung intravenös, die schwer wasserlöslichen Substanzen in Form einer Traganthsuspension bzw. einer Emulsion mit Apfelpektin oder mit Oximazon* als Lösungsvermittler intraperitoneal verabfolgt.

6.2 Tiermaterial

Die Untersuchungen wurden an weiblichen Albinoratten (S.P.F.**) des Stammes Sprague-Dawley*** durchgeführt. Die Haltungsbedingungen in den Versuchsräumen waren weitgehend konstant (Raumtemperatur 20 - 22° C, relative Luftfeuchtigkeit etwa 60 %, Fütterung mit der Standarddiät Altromin R(W) mit Trinkwasserzugabe ad libitum). Das Gewicht der verwendeten Tiere betrug im Durchschnitt 120 bis 150 g.

6.3 Letalitätsbestimmung

In einem Vorversuch wurde die betreffende Prüfsubstanz zunächst an je zwei Ratten in einer Dosierung von 25, 50, 100, 200, 400 und 800 mg/kg appliziert und die Absterberate innerhalb von 14 Tagen beobachtet. Die höchste Dosis, bei der keine Ratte mehr gestorben war, wurde als Schätzwert für die DL 5 (Dosis tolerata maxima) angenommen. Sie stellt den Basiswert für die daran anschliessende Bestimmung der letalen und kurativen Wirksamkeit dar. Im eigentlichen Letalitätsversuch wurde die Prüfsubstanz an je 10 Tieren mit einem Dosenabstand von Faktor 1,47 appliziert und die Absterberate innerhalb von 14 Tagen erfaßt. Die letalen Wirkungsgeraden wurden mit der Probitanalyse berechnet [63].

---

* Oximazon = 1-Methyl-3-(2-hydroxy-äthyl)-imidazolidon(2)

** specific pathogen free

*** Zucht: Versuchstierlaboratorien der Asta-Werke AG, Brackwede

6.4 Tumor-Screening am Yoshida-Ascites-Sarkom

Zur Bestimmung der kurativen Wirkungsgeraden wurde, ausgehend von der DL 5, eine absteigende Dosisreihe (f = 2,0 bzw. 1,47) an Ratten appliziert. Etwa 3 Stunden zuvor wurden die Tiere mit einem chemosensiblen Yoshida-Ascites-sarkom (Tokio) intraperitoneal beimpft. Die Stichprobengröße betrug n = 8. Nach Bestimmung der Heilungsrate (Kriterium: 90 Tage Rezidiv- und Metastasenfreiheit) wurde die Dosis-Wirkungs-Kurve mittels der Probitanalyse ermittelt.

6.41 Versuchstechnik

Zur Verimpfung wurde Tumor-Ascites von einem Tier mit 5 bis 7 Tage altem Yoshida-Ascites-Sarkom steril (bakteriologische Kontrolle) entnommen. Den Gehalt an Tumorzellen kontrollierte ich in einer Leukozyten-Zählkammer. Er betrug im Durchschnitt 2×10^5 Zellen/µl. Nachdem durch Zugabe von Tyrode-Lösung ein Zellgehalt von 10^5 Zellen/µl eingestellt worden war, erhielt jedes Tier intraperitoneal 0,4 ml Tumorascites ($\triangleq 4 \times 10^7$ Zellen). Die Angangsrate dieser Versuche lag bei 95 % der beimpften Ratten, die mittlere Absterbezeit der unbehandelten Kontrolltiere bei 8 Tagen [Konfidenz-Intervall (a = 0,05; n - 1 = 99) 6,5 bis 9,5 Tage].

6.5 Hämatologische Untersuchungen an Ratten

Als Kriterium für die leukotoxische Wirkung bewertete ich den Abfall der Leukozyten im Blut. Zu diesem Zweck wurde zunächst der normale Ausgangswert durch eine Doppelbestimmung der Gesamtleukozyten sowie der Granulozyten und Lymphozyten (2 Tage vor und am Tage der Applikation) festgestellt. Nach der Applikation der Prüfpräparate erfolgte die hämatologische Untersuchung am 1., 3., 7., 10. und 14. Tag nach der Applikation.

Zur quantitativen Erfassung der jeweiligen Tageswerte der Gesamtleukozyten, Granulo- und Lymphozyten wurden diese

zum normalen Ausgangswert (= 100 %) in Beziehung gesetzt. Dabei ergibt sich, daß der Tageswert entweder dem Ausgangswert entspricht oder um x % gefallen bzw. angestiegen ist.

6.51 Blutgewinnung

Die Blutentnahme zur Leukozytenzählung wurde bei Ratten in leichter Äthernarkose vorgenommen, und zwar stets morgens zur gleichen Zeit. Die gestaute Vena sublingualis wurde mit einer 20er Kanüle angestochen, nachdem zuvor der Speichel abgetupft worden war. Diese Methode hat gegenüber allen anderen Verfahren (Schwanzkupierung, Punktion des retrobulbären Venenplexus) Vorteile; sie ist einfach und schnell durchzuführen und liefert gut reproduzierbare Werte. Der Blutstropfen wurde in einem Blockschälchen aufgefangen.

6.52 Blutzellzählung

Zur Leukozytenzählung des frisch entnommenen Blutes wurden 0,04 ml desselben mit einer Spezialpipette aufgezogen und in 20 ml 0,9 % NaCl-Lösung gegeben (Verdünnung 1 : 500). Durch gründliches Mischen wurde ein Gerinnen des Blutes verhindert. Nachdem 0,2 ml dieser Lösung zur Erythrozytenzählung entnommen worden waren, wurde 10 min vor der Zählung 0,2 ml 2-%ige Saponinlösung zugesetzt. Saponin zerstört zunächst die Erythrozyten; nach längerem Stehen (etwa 30 min) werden auch die Leukozyten angegriffen.Die Zählung wurde deshalb in einem Zeitraum zwischen 5 und 30 min nach Zugabe der 2 %igen Saponinlösung vorgenommen. Es wurden zwei Messungen an derselben Verdünnung nacheinander durchgeführt. Hierzu wurde der elektronische Zähler Modell "D" der Firma COULTER Electronics Ltd, St. Albans, England, verwendet.

Den entscheidenden Gedanken für die Entwicklung elektronischer Geräte hatte COULTER [22, 23], dem es gelang, den hohen Widerstand intakter

Zellen zu einer Impulsgewinnung auszunutzen. Das Gerät arbeitet nach folgendem Prinzip: Zwei Räume A und B sind mit einer isotonischen Lösung gefüllt und lediglich durch eine feine kapillare Öffnung miteinander verbunden. In die beiden Räume tauchen Elektroden, an die eine konstante Gleichspannung angelegt wird. Saugt man mit Hilfe eines an den Raum B angelegten Vakuums suspendierte Zellen von A nach B, so vergrößert sich der Ohmsche Widerstand zwischen den beiden Elektroden jedesmal dann, wenn eine Zelle die Öffnung passiert. Sind die Zellen wesentlich kleiner als die Öffnung, so sind die Widerstandserhöhungen den Zellvolumina annähernd proportional. Die gemäß dem Ohmschen Gesetz ($I = \frac{U}{R}$) bei konstanter Stromstärke an einem Widerstande abfallenden Spannungsimpulse werden verstärkt, von einem elektronisch-mechanischen Zählwerk registriert und gleichzeitig auf dem Schirm eines BRAUNschen Rohres dargestellt. Es können bis zu 5000 Zellen/s gezählt werden, wobei die Mindest-Impulshöhe (Schwellwert) von Hand eingestellt werden kann. Hierdurch ist die Unterscheidung verschiedener Zellvolumina möglich. Bei jeder Zählung werden 0,5 ml der Suspension mit gleichbleibender Geschwindigkeit durch die Kapillare gesaugt. Die Kapillare hat einen Durchmesser von 100 µm und ist in ein Saphirplättchen gebohrt.

Von KUBITSCHEK, sowie von RUHENSTROTH-BAUER und von ZANG sind grundlegende Untersuchungen über die Leistungsfähigkeit und die Breite des Coulterschen Meßprinzips angestellt worden [42, 43, 44, 52, 64]. Dabei wurden nicht nur die durch Mehrfachdurchtritte verursachten Koinzidenzverluste und die Abhängigkeit der gemessenen Zellvolumina von der Leitfähigkeit der verwendeten Elektrolyt-Lösung

untersucht, sondern auch die Abhängigkeit der Impulshöhe von der Geschwindigkeit der Zelldurchtritte bewiesen [42, 43, 44, 47, 48, 49, 52, 64].

6.53 Blutzell-Differenzierung

Zur Blutzell-Differenzierung wurden mittels eines Deckgläschens mehrere Ausstriche auf Objektträger angefertigt. Die fertigen Ausstriche läßt man an der Luft trocknen und dann nach der Methode nach PAPPENHEIM färben. Die gefärbten Ausstriche werden anschließend differenziert. Die Auswertung der Ausstriche erstreckte sich auf je 100 Zellen. Für jedes Tier wurden zwei Präparate, also 200 Zellelemente, durchgemustert.

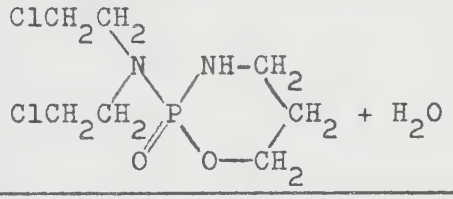
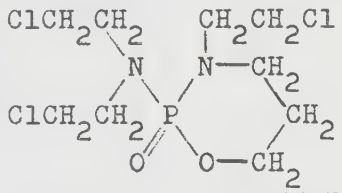
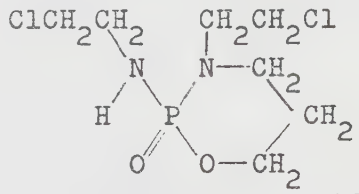
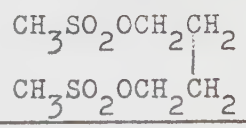
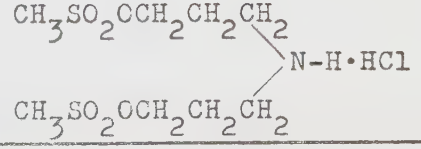
7. Ergebnisse des pharmakologischen Screenings

Zur Charakterisierung der in den folgenden Tabellen aufgeführten Verbindungen wurden aus den entsprechenden Wirkungsgeraden die Werte der DL 50 und der DC 50 bei einmaliger intravenöser bzw. intraperitonealer Applikation ermittelt und hieraus der D 50-Index berechnet. Um die Vergleichsbasis zu verbessern, wurde darüber hinaus die DC 50 in Therapeutischen Einheiten, d.h. in Prozent der DL 50 [27] ausgedrückt. Die Kinetik der Leukozytenveränderung nach Applikation der Prüfsubstanzen wurde graphisch dargestellt. Aus ihrem Verlauf wurde der Wirkungstyp festgestellt und in den Tabellen angegeben. Bei einigen Substanzen war die leukotoxische Wirksamkeit zu gering, um eine eindeutige Zuordnung zu ermöglichen.

7.1 Standardsubstanzen

In Tab. 1 sind die pharmakologischen Ergebnisse für die Standardpräparate, und zwar für Cyclophosphamid, Trofosfamid und Ifosfamid als Vertreter der N-Lost-Verbindungen und für Busulfan und Substanz 864 (SAKURAI) als Vertreter der Alkylsulfonyloxyalkyl-Derivate zusammengestellt.

Tabelle 1

Substanz	Strukturformel	Fp °C	Appl. art	DL 50(1) [mg/kg]	DC 50(1) [mg/kg]	DC 50(1) T.E.	DL 50 / DC 50	Wirk-typ
Cyclophosphamid		49,5-53	iv.	196	2,5	1,3	78	L
Trofosfamid		51-53	iv.	110	2,5	2,3	44	L
Ifosfamid		48-51	iv.	258	2,5	1,0	103	L
Busulfan		117-118	ip.	20	>10,0	>50		B
Nr. 864 (SAKURAI)		104-106	iv.	75	25,0	33	3	B

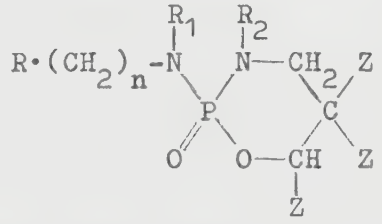
Die drei N-Lost-Verbindungen zeichnen sich durch eine große therapeutische Breite aus. Mit einem DC 50-Wert von 2,5 mg/kg erwiesen sich alle 3 Präparate gegenüber dem chemosensiblen Yoshida-Ascites-Sarkom als hochwirksam, die Unterschiede im D 50-Index resultieren aus der unterschiedlichen Toxizität (DL 50). Ifosfamid liegt mit einem Indexwert von 103 vor Cyclophosphamid (78) und Trofosfamid (44).

Busulfan war am Yoshida-Ascites-Sarkom unwirksam, dagegen erwies sich Verbindung 864 in Bestätigung der Befunde von SAKURAI als tumorwirksam. Der D 50-Index betrug allerdings nur 3.

Der Verlauf der Granulo- bzw. Lymphozytenkurve für Cyclophosphamid und Busulfan ist aus Abb. 16 zu ersehen. Der Verlauf entspricht der bereits von ELSON gegebenen Gruppen-Charakterisierung (Abb. 13).

7.2 Allgemeine Strukturprinzipien

Zum besseren Verständnis der aus den folgenden Tabellen ersichtlichen Abhängigkeit der pharmakologischen Wirkung von der chemischen Konstitution soll die Allgemeinformel I dienen, von der sich die untersuchten Oxazaphosphorine in einfacher Weise ableiten lassen:

I 

In dieser Formel ist

R ein Halogenatom oder die Alkylsulfonyloxy-Gruppe

R_1 und R_2 Wasserstoff oder ein niedermolekularer Alkylrest mit 1 - 3 Kohlenstoffatomen, der ein Halogenatom oder die Alkylsulfonyloxy-Gruppe tragen kann.

Dabei können R, R_1 und R_2 entweder gleich oder verschieden sein. Die Alkylsulfonyloxy-Gruppe muß wenigstens einmal vorhanden sein.

Z ist Wasserstoff oder teilweise Methyl. n = 2 oder 3

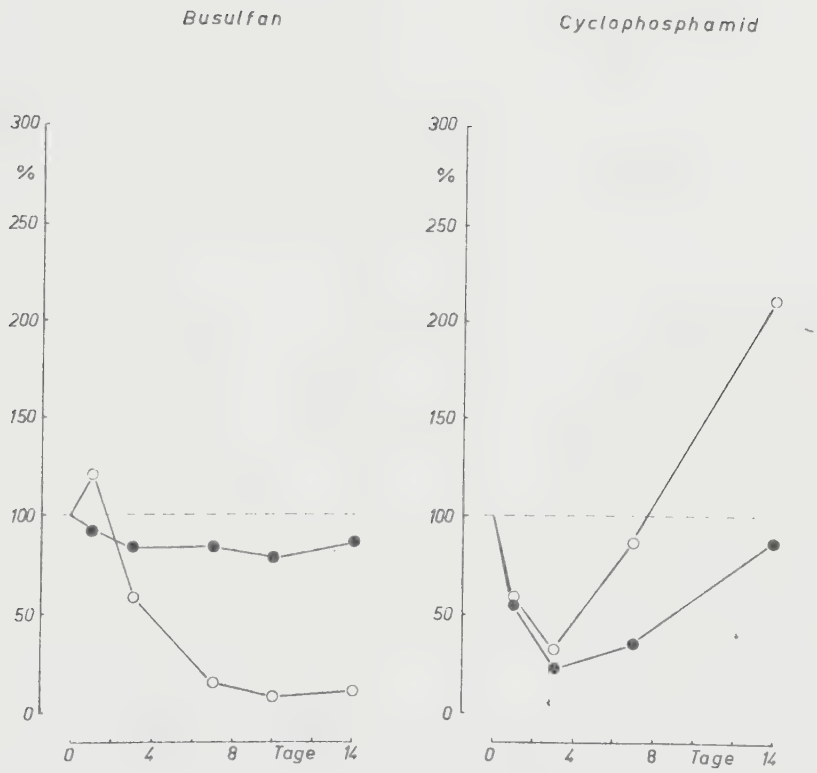


Abb. 16

Verhalten der Granulozyten (○) und Lymphozyten (●)
nach Applikation von Busulfan (15 mg/kg)
und Cyclophosphamid (45 mg/kg)
Ordinate: Prozent der normalen Ausgangswerte

Nach ELSON [31]

7.3 Kompletter Austausch der 2-Chloräthyl-Gruppe durch 2-Mesyloxyäthyl- bzw. Alkylsulfonyloxyalkyl-Gruppen im Cyclophosphamid, Trofosfamid und Ifosfamid

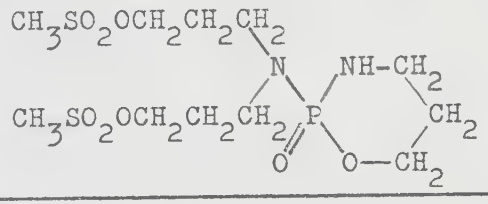
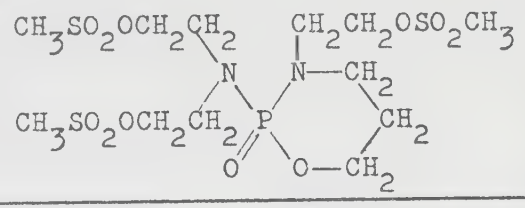
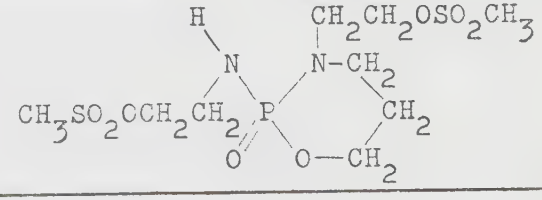
Die Synthese der interessierenden 2-Mesyloxyäthyl-Verbindungen führte auf der Grundlage des Trofosfamids und Ifosfamids zu den angestrebten Verbindungen (Nr. 5765 und 5543), dagegen konnte das Analoge des Cyclophosphamids chemischerseits bislang nicht hergestellt werden. Statt der vorgesehenen 2-Mesyloxyäthyl-Substitution wurde die entsprechende 2-Mesyloxypropyl-Verbindung (Nr. 4809) synthetisiert und pharmakologisch untersucht. Die Ergebnisse mit den reinen Alkylsulfonyloxyalkyl-Derivaten sind in Tab.2 zusammengestellt.

Die 2-Mesyloxyäthyl-Verbindungen Nr. 5765 und 5543 sind relativ wenig toxisch, besitzen aber im Vergleich mit den entsprechenden 2-Chloräthyl-Derivaten Trofosfamid und Ifosfamid auch nur eine relativ schwache Tumorwirksamkeit. So ist der D 50-Index erheblich geringer als bei den erwähnten Standardpräparaten. Verbindung 4809 fällt im D 50-Index noch weiter ab, da die Toxizität erhöht, die kurative Wirksamkeit vermindert ist. Im Wirkungstyp besteht bei Verbindung 4809 und 5765 Übereinstimmung mit Busulfan, bei Verbindung 5543 ist die leukotoxische Wirkung zu schwach, um eine eindeutige Aussage machen zu können.

7.4 Partieller Austausch der funktionellen 2-Chloräthylgruppen gegen die Alkylsulfonyloxyalkyl-Gruppe im Trofosfamid

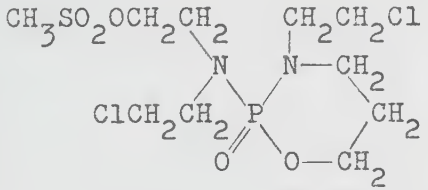
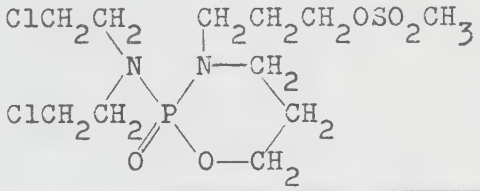
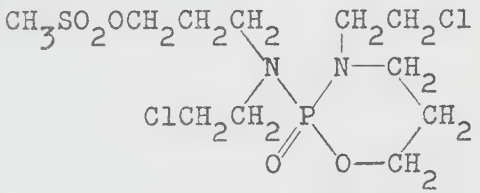
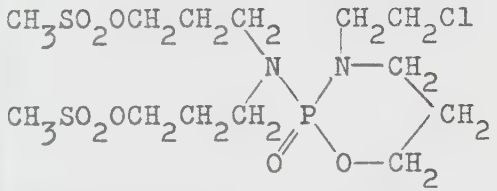
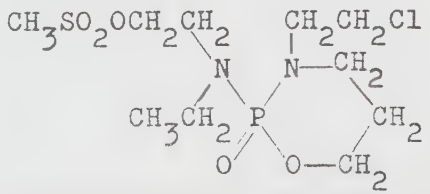
In Tab. 3 sind gemischt funktionelle Verbindungen zusammengestellt, die sich formal vom Trofosfamid ableiten. Bei der Mehrzahl der Substanzen betrifft der Austausch die extrazyklische Lostkomponente, in der eine oder beide 2-Chloräthyl-Gruppen durch die Alkylsulfonyloxyalkyl-Gruppe (Nr. 5571, 4895, 4936) bzw. durch eine halogenfreie Alkylgruppe (Nr. 5564) ersetzt wurden.

Tabelle 2

Substanz	Strukturformel	Brechungs-Index	Appl. art	DL 50(1) [mg/kg]	DC 50(1) [mg/kg]	DC 50(1) T.E.	DL 50 / DC 50	Wirk-typ
4808		n_D^{20}:1,4947	ip.	~150	~100	67	1,5	B
5765		n_D^{25}:1,4905	ip.	>800	~40	4	25	B
5543		n_D^{22}:1,4955	ip.	~400	~25	6,2	16	*

*fehlende leukotoxische Wirksamkeit

Tabelle 3

Substanz	Strukturformel	Brechungs-Index	Appl. art	DL 50(1) [mg/kg]	DC 50(1) [mg/kg]	DC 50(1) T.E.	DL 50 / DC 50	Wirk-typ
5571		n_D^{21}:1,0530	ip.	~12,5	2,5	20	5,0	L
5131		n_D^{21}:1,5060	ip.	660	~25	3,8	26,4	L
4895		n_D^{26}:1,5048	ip.	127	~ 5	3,9	25,4	L
4936		n_D^{21}:1,5050	ip.	~300	~12,5	4,2	24	[L]
5564		n_D^{21}:1,4950	iv.	~ 12,5	5	40	2,5	[L]

[ ] = geringe leukotoxische Wirksamkeit

In Verbindung 5131 wurde dagegen der Ersatz der am zyklischen Stickstoff gebundenen 2-Chloräthyl-Gruppe durch die Methylsulfonyloxypropyl-Gruppe vorgenommen.

Mit Indexwerten um 25 liegen die Substanzen Nr. 4936, 4895 und 5131 in dieser Aufstellung an der Spitze und verdienen damit auch im Hinblick auf die Muttersubstanz Trofosfamid ein gewisses Interesse. Die anderen Präparate der Tab. 3 sind chemotherapeutisch ohne Interesse, da sie entweder eine zu geringe kurative oder eine zu hohe toxische Aktivität besitzen.
Alle Verbindungen der Tab. 3 entsprechen in ihrer leukozytären Reaktion dem N-Lost-Typ.

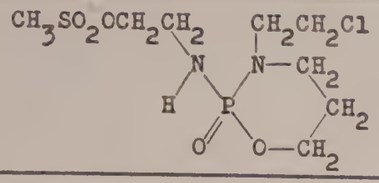
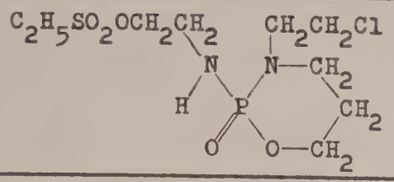
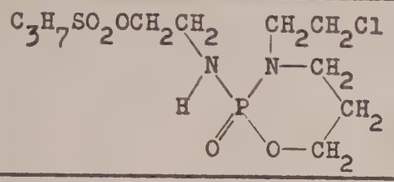
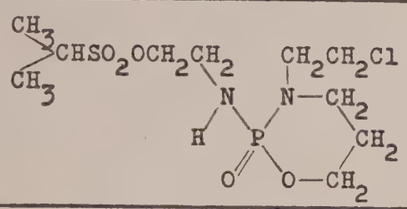
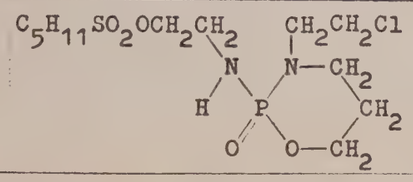
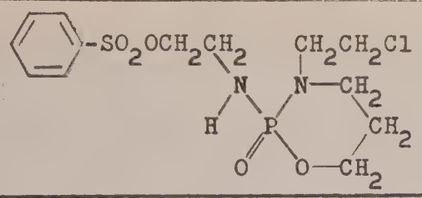
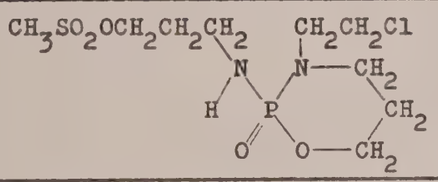
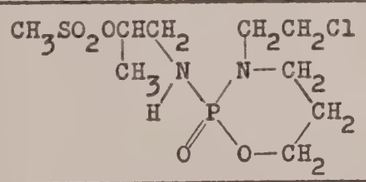
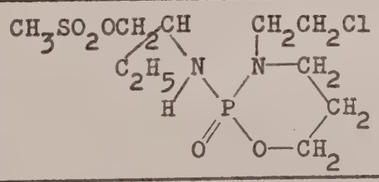
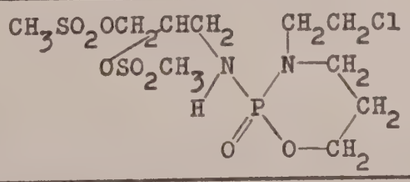
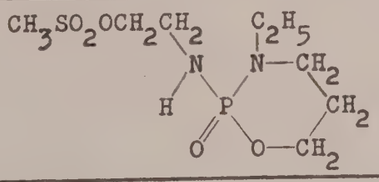
7.5 Partieller Austausch der funktionellen 2-Chloräthyl-Gruppen gegen Alkylsulfonyloxyalkyl-Gruppen im Ifosfamid

Den Substanzen, die sich formal von Ifosfamid ableiten, kommt auch auf Grund der chemotherapeutischen Eigenschaften besonderes Interesse zu. Je nach der erfolgten Variation läßt sich die Hauptgruppe in 3 Untergruppen unterteilen.

7.51 Variation der extrazyklischen Alkylsulfonyloxyalkylamino-Gruppe

Die Verbindungen der Tabelle 4 sind charakterisiert durch die Variation der extrazyklischen Alkylsulfonyloxyalkylamino-Gruppe. Beginnend mit Präparat 5122 (D 50-Index = 34,8) wird in den folgenden fünf Gliedern dieser Reihe die endständige Alkylgruppe vergrößert. Mit einem D 50-Index von 62,5 besitzt Präparat 5607 die größte therapeutische Breite und übertrifft damit das unter ihr, vor allem aber die über ihr stehenden Homologen beträchtlich. Von den wirksamen Varianten sind die Präparate 5840 und 5841 hervorzuheben. Sie sind sowohl in kurativer als auch in toxischer Hinsicht zwar rund fünffach schwächer wirksam als Substanz 5607, ihr D 50-Index erreicht aber immerhin noch einen Wert von 60. Die monofunktionelle Verbindung 5752 ist

Tabelle 4

Substanz	Strukturformel	Fp °C	Brechungs-Index	Appl. art	DL 50(1) [mg/kg]	DC 50(1) [mg/kg]	DC 50(1) T.E.	DL 50 / DC 50	Wirk-typ
5122		81-82		iv.	174	5	2,8	34,8	L
5607		62-64		iv.	125	2	1,6	62,5	L
5764		78		ip.	248	~10	4,0	24,8	L
5772			n_D^{20}:1,4927	ip.	165	~7,5	4,5	22,0	B
5783		59-60		ip.	165	~12,5	7,6	13,2	B
5773			n_D^{21}:1,5323	ip.	198	~12,5	6,3	15,8	B
5130		59-60		iv.	~1000	~100	~10	10	[B]
5841		100-101		iv.	~600	~10	1,7	60	L
5840		129-130		ip.	~600	~10	1,7	60	L
5855			n_D^{22}:1,5025	ip.	>800	~200	<25	>4	*
5752		104-105		ip.	>800	>200			*

[ ] = geringe leukotoxische Wirksamkeit

* = fehlende leukotoxische Wirksamkeit

praktisch unwirksam; damit bestätigt sich die Erfahrung, daß unter den alkylierenden Substanzen bi- bzw. trifunktionelle Verbindungen chemotherapeutisch besonders wirksam sind.

Interessanterweise verhalten sich die gemischt funktionellen Verbindungen der Tab. 4 in ihrer leukozytären Reaktion nicht einheitlich. Eindeutig dem N-Lost-Typ folgen die Präparate 5122, 5607, 5764, 5840 und 5841. Die homologen Verbindungen 5772, 5783, 5773 entsprechen aber dem Busulfantyp, dem auch die schwach wirksame Verbindung 5130 nahesteht. Hier ist also innerhalb einer homologen Reihe eine Änderung des Wirkungstyps zu beobachten.

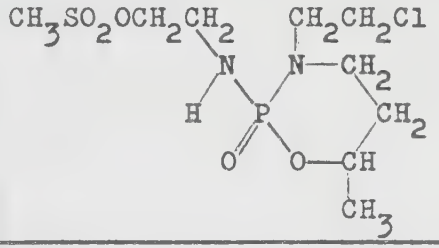
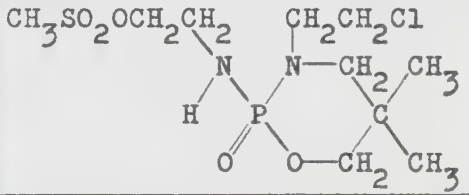
7.52 Alkylsubstitution an den C-Atomen des Oxazaphosphorin-Rings bei extrazyklisch substituierten 2-Mesyloxyäthylamino-Verbindungen

In Analogie zu den Ergebnissen mit Ringsubstituenten beim Cyclophosphamid haben wir den Einfluß der einfachen Methylsubstitution am C-Atom 6 und der zweifachen Methylsubstitution am C-Atom 5 des Oxazaphosphorin-Ringes geprüft. Wie ein Blick auf die Index-Werte der Tab. 5 zeigt, war durch einfache Methylsubstitution (Verbindung 5712) im Vergleich zum Präparat 5122 noch eine weitere Vergrößerung der therapeutischen Breite zu erzielen. Dieser Gewinn geht auf das Konto einer verminderten Toxizität. Die kurative Wirksamkeit (DC 50 = 5 mg/kg) ist bei beiden Präparaten gleich. Verbindung 5712 gelangt damit ebenfalls in die engere Wahl.

Bei zweifacher Methylsubstitution am Kohlenstoff 5 des Oxazaphosphorin-Ringes und der damit erfolgten Quarternisierung des Kohlenstoff-Atoms kommt es dagegen zum völligen Verlust der kurativen Wirksamkeit. Dies wurde auch bei der analogen Verbindung in der Reihe der N-Lost-Phosphamidester (Verbindung B 707 [3]) beobachtet.

Verbindung 5712 gleicht vom Wirktyp her dem Busulfan, obwohl die nicht ringmethylierte Verbindung 5122 eindeutig dem N-Lost-Typ entspricht.

Tabelle 5

Substanz	Strukturformel	Fp °C	Brechungs-Index	Appl. art	DL 50(1) [mg/kg]	DC 50(1) [mg/kg]	DC 50(1) T.E.	DL 50 / DC 50	Wirk-typ
5712		104		iv.	336	~5	1,5	67	B
5608			n_D^{22}:1,4912	iv.	> 800	> 200			*

* fehlende leukotoxische Wirksamkeit

7.53 Variation der Mesyloxyalkylgruppe am Oxazaphosphorin-Ring

Die indieser Untergruppe (Tab. 6) befindlichen 2 Präparate unterscheiden sich von den Verbindungen der Tabelle 4 dadurch, daß die Alkylsulfonyloxyalkyl-Gruppe endozyklisch, d.h. am Stickstoffatom des Oxazaphosphorin-Ringes substituiert wurde. Substanz 5606 stellt das Strukturisomere der Verbindung 5122 und Substanz 5542 das Strukturisomere der Verbindung 5130 dar.

Bei einer solchen Umstrukturierung wird offensichtlich die biologische Aktivität der Präparate gemindert. Immerhin verdient Verbindung 5606 weiterhin Interesse, da im Vergleich zum Strukturisomeren Präparat 5122 die kurative Wirkung zwar um den Faktor 2, die toxische aber um den Faktor 3 sich vermindert. Der Wert des D 50-Index stieg damit von 34,8 auf 60 an. Verbindung 5542 ist dagegen auf Grund der geringen pharmakologischen Wirksamkeit ohne Interesse.

Hinsichtlich der leukozytären Reaktion entspricht Verbindung 5606 dem N-Lost-Typ.

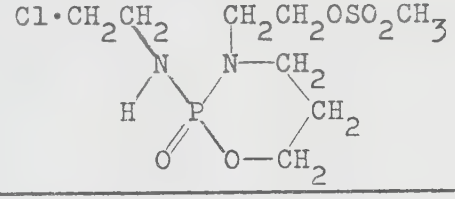
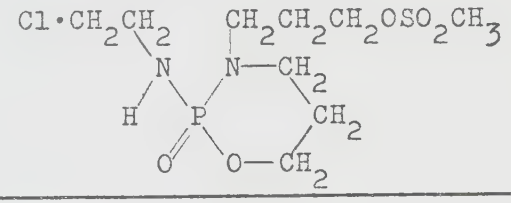
7.6 Bewertung und Diskussion

Die Entscheidung über Annahme oder Ablehung der hier untersuchten Präparate stützt sich auf den D 50-Index, den Quotienten aus der DL 50 und der DC 50. Unter Berücksichtigung der für die drei Standardsubstanzen Cyclophosphamid, Ifosfamid und Trofosfamid ermittelten Indices wurde ein kritischer Grenzwert von 30 angenommen; alle Substanzen mit einem höheren Indexwert als 30 gelangten in die engere Auswahl und wurden für eine spätere eingehende pharmakologische Prüfung vorgesehen, siehe Tab. 7.

Darüber hinaus wurden - mit einem Indexwert zwischen 20 und 30 - Substanzen zweiter Wahl in Tabelle 8 zusammengestellt.

Die restlichen Substanzen wurden verworfen.

Tabelle 6

Substanz	Strukturformel	Fp °C	Appl. art	DL 50(1) [mg/kg]	DC 50(1) [mg/kg]	DC 50(1) T.E.	DL 50 / DC 50	Wirk-typ
5606		58-59	iv.	~600	10	1,7	60	L
5542		72	iv.	>800	>100			*

*fehlende leukotoxische Wirksamkeit

Tabelle 7

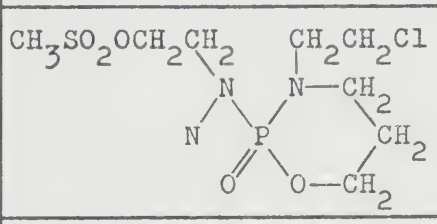
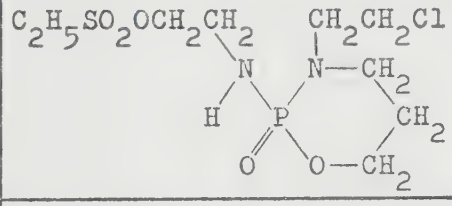
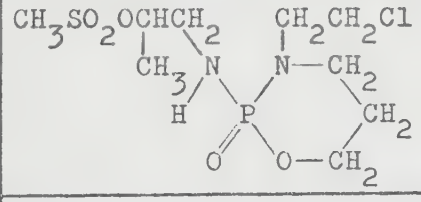
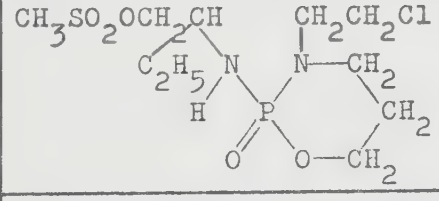
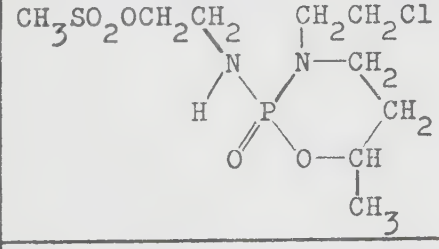
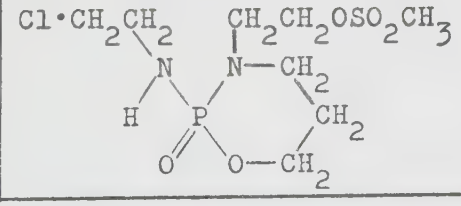
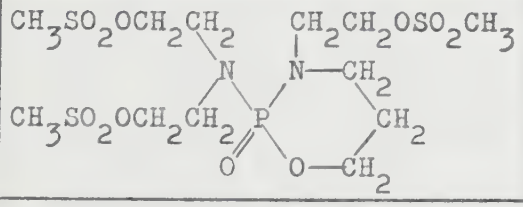
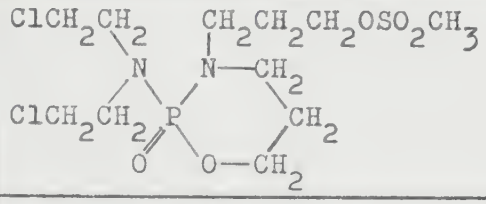
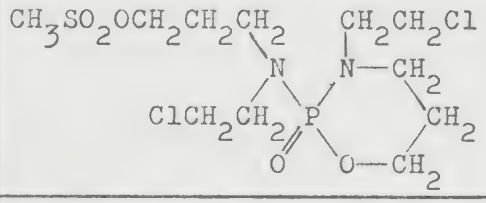
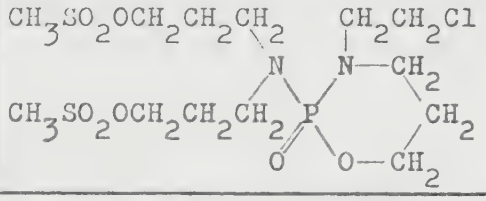
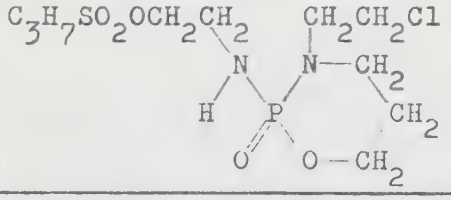
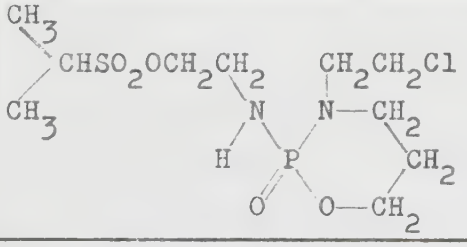
Substanz	Strukturformel	DC 50 [mg/kg]	DC 50 T.E.	D 50-Index	Wirk-typ	Tabelle
5122		5	2,8	34,8	L	4
5607		2	1,6	62,5	L	4
5841		10	1,7	60	L	4
5840		10	1,7	60	L	4
5712		5	1,5	67	B	5
5606		10	1,7	60	L	6

Tabelle 8

Substanz	Strukturformel	DC 50 [mg/kg]	DC 50 T.E.	D 50-Index	Wirk-typ	Tabelle
5765		31,6	4	25	B	2
5131		25	3,8	26,4	L	3
4895		5	3,9	25,4	L	3
4936		12,5	4,2	24	[L]	3
5764		10	4,0	24,8	L	4
5772		10	4,5	22	B	4

[ ] = geringe leukotoxische Wirksamkeit

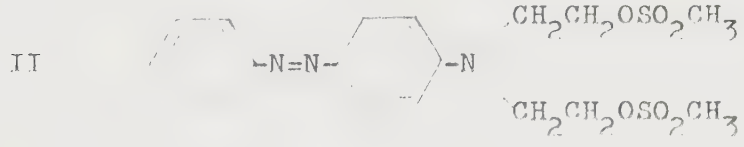
Die in Tab. 7 aufgeführten Substanzen zeichnen sich durch eine relativ starke kurative Wirksamkeit aus. Die DC 50-Werte liegen zwischen 2 und 10 mg/kg und entsprechen damit 1,5 bis 2,8 Therapeutische Einheiten.

Die Verbindungen der Tabelle 8 sind kurativ schwächer wirksam (DC 50 zwischen 5 und 31,6 mg/kg). Damit mindern sich die Chancen einer möglichen therapeutischen Anwendung, da erfahrungsgemäß mit dem kurativen Wirkungsabfall zumeist auch die Tumorselektivität absinkt. Aus diesem Grunde wurde das Screening entsprechend scharf eingestellt und nur solche Substanzen in die engere Auswahl genommen, die hinsichtlich des D 50-Index, aber auch hinsichtlich der kurativen Wirksamkeit in etwa den drei vorgegebenen Standardsubstanzen entsprachen. Dies war im vorliegenden Fall besonders wichtig, da die Versuche an einem gegen alkylierende Substanzen sehr empfindlichen Yoshida-Sarkom unternommen wurden.

Was die hämatologischen Effekte der untersuchten Präparate angeht, konnte für die reinen N-Lost-Derivate die bevorzugt lymphotoxische Wirkung (N-Lost-Typ) und für die reinen Alkylsulfonyloxyalkyl-Derivate die bevorzugt myelo(granulo)-toxische Wirkung (Busulfan-Typ) bestätigt werden. Bei den gemischt funktionellen Verbindungen ergab sich dagegen ein uneinheitliches Bild. Die trifunktionellen Substanzen (Tab. 3) folgen, unabhängig von dem Verhältnis und der Position der reaktiven Gruppen, dem N-Lost-Typ. Dasselbe ist bei den bifunktionellen Verbindungen der Fall, bei denen die Alkylsulfonyloxyalkylgruppe ringständig substituiert wurde (Tab. 6). Dagegen finden sich in der Gruppe der bifunktionellen Substanzen mit extrazyklischen Alkylsulfonyloxyalkyl-Gruppen beide hämatologischen Wirkungstypen (Tab. 4 und 5), ohne daß eindeutige Struktur-Wirkungs-Beziehungen erkennbar sind.

ELSON [31] hat sich in seinen Arbeiten über die hämatologischen Effekte von alkylierenden Substanzen bereits 1958 mit diesen Problemen befaßt. Seine Erfahrungen sind in einer Tabelle

zusammengestellt (Abb. 17). Die Frage nach der biochemischen Begründung für die verschiedenen Reaktionstypen ist nach ELSON noch ungeklärt. Unterschiede im Mechanismus der Alkylierung: - N-Lost folgt in seinem Wirkmechanismus vorwiegend dem S_N1-Typ, Busulfan vorwiegend dem S_N2-Typ - spielen dabei aber ohne Zweifel eine wichtige Rolle. Die naheliegende Annahme, daß der unterschiedliche Wirkungstyp durch die chemische Verschiedenheit der reaktiven Gruppen zu erklären ist, ließ sich jedoch in dieser allgemeinen Form nicht halten, da entscheidende Ausnahmen von dieser Regel beobachtet wurden. So entsprach Verbindung II, die wie Busulfan zwei Mesylgruppen enthält,

II 

in ihrem hämatologischen Wirkungsbild nicht dem Busulfan-, sondern dem N-Lost-Typ. Umgekehrt zeigte unter den alkylierenden Substanzen das Butadien-di-epoxid, von dem angenommen wird, daß es nach dem S_N2-Typ reagiert, ebenso wie Triäthylenmelamin (TEM) das hämatologische Wirkungsbild des Stickstofflosts und nicht des Busulfans. So müssen auch andere Faktoren, z.B. unterschiedliche physikochemische Eigenschaften der Substanzen selbst oder ihrer Metaboliten, unterschiedliche Permeabilitätsverhältnisse der verschiedenen Zelltypen und damit zusammenhängend ein unterschiedliches Permeationsvermögen der verschiedenen Substanzen, selektive Konzentrationen im Lymph- bzw. Knochenmarkgewebe zur Erklärung der hier beschriebenen Phänomene berücksichtigt werden. Ihre Analyse ist aber künftigen Untersuchungen vorbehalten.

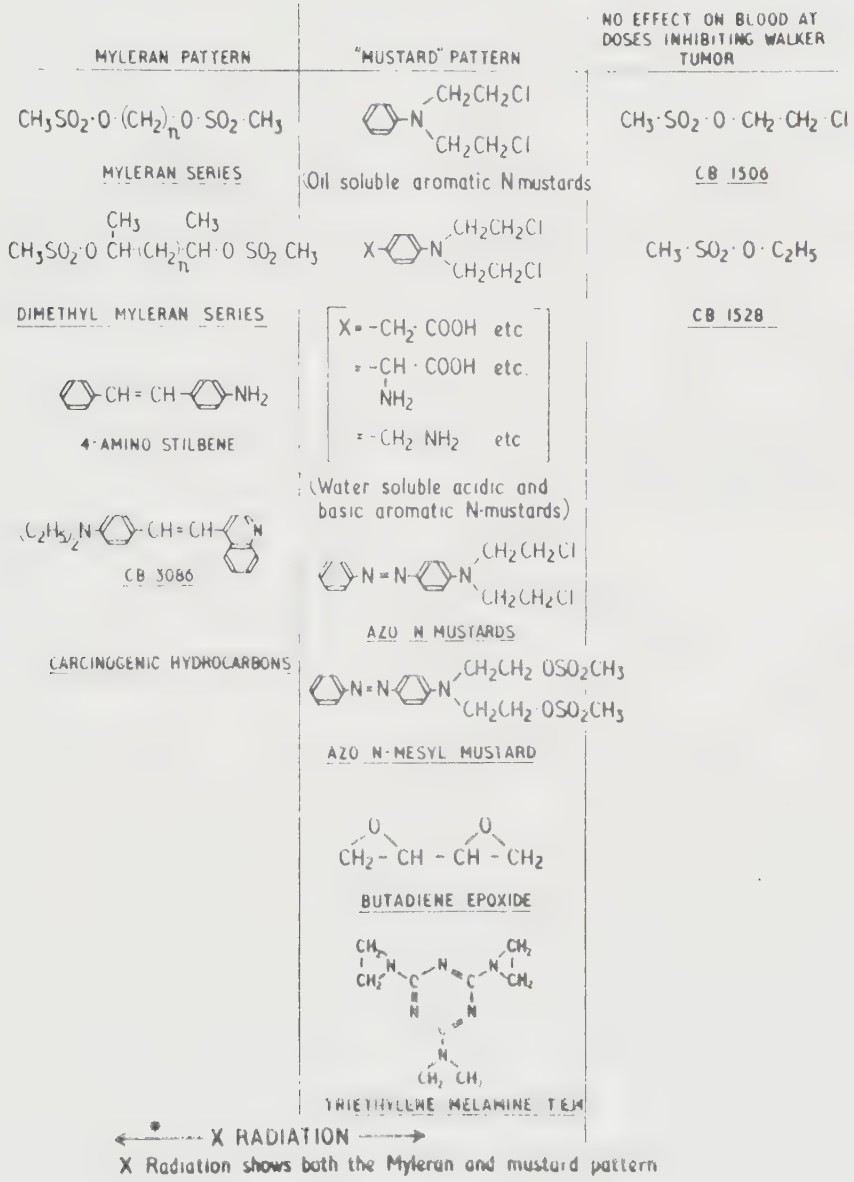


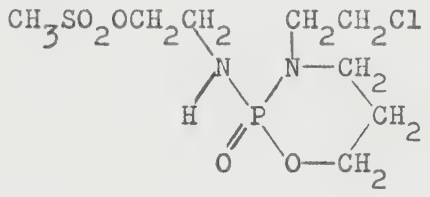
Abb. 17 Charakteristische Blutbild-Veränderungen nach karzinogen bzw. zytostatisch wirksamen Substanzen nach ELSON [31]

8. Zur pharmakologischen Charakterisierung von ASTA 5122

Aus den im Screening als aussichtsreich beurteilten Substanzen (Tab. 7) wurde als erste Verbindung ASTA 5122 zur genaueren pharmakologischen Prüfung ausgewählt. Am Beispiel dieses Versuchspräparates sollte der Wirkungstyp dieser gemischt funktionellen Verbindung näher bestimmt und etwaige Unterschiede zur Standardsubstanz Cyclophosphamid ermittelt werden.

8.1 Chemie

ASTA 5122 ist chemisch das 3-(2-Chloräthyl)-2-(2-mesyloxyäthylamino)-perhydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid mit folgender Strukturformel:



Die Verbindung steht in ihrer Struktur dem Ifosfamid nahe. Doch enthält sie im Gegensatz zu diesem zwei verschiedene zur Alkylierung befähigte Gruppen, und zwar eine 2-Chloräthyl- und eine Methylsulfonyloxyäthyl-Gruppe. Erstere ist an das N-Atom des Oxazaphosphorin-Ringes und letztere an das extrazyklische N-Atom gebunden. Von Cyclophosphamid und allen anderen Stickstofflost-Verbindungen unterscheidet sich die chemische Struktur von ASTA 5122 dadurch, daß sich die beiden funktionellen Gruppen nicht am gleichen Stickstoffatom befinden.

ASTA 5122 ist sowohl in Wasser als auch in Äthanol, Äther und Methylenchlorid gut löslich, in destilliertem Wasser z.B. bis zu 10 %.

8.2 Pharmakologie

Im Rahmen der pharmakologischen Prüfung von ASTA 5122 wurde die chemische Reaktivität der Verbindung in wässriger Lösung, ferner die kanzerotoxische Wirkung gegen Krebszellen in vitro sowie die chemotherapeutische Wirksamkeit in vivo gegen Experimentaltumoren im Vergleich mit Cyclophosphamid bestimmt. Darüber hinaus wurden die leukotoxische Wirkung als wichtigste organotrope Wirkkomponente quantitativ erfaßt sowie Letalitätsbestimmungen unter verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführt. Bestimmungen der alkylierenden Aktivität im Blutserum nach Gabe des Versuchspräparates sollten den ersten Einblick in den Metabolismus und damit den speziellen Wirkmechanismus ermöglichen.

8.21 Chemische Aktivität in vitro

Um ein Urteil über die Reaktivität der ringgebundenen 2-Chloräthyl-Gruppe zu gewinnen, verfolgten wir die Dissoziation der Chlorid-Ionen in wässriger Lösung von ASTA 5122 in Bicarbonat. Wie aus Abb. 18 hervorgeht, sind nach 28 Tagen von ASTA 5122 nur 0,59 val/mol Chlorid-Ionen abgespalten gegenüber 1,9 val/mol Chlorid-Ionen bei Cyclophosphamid. ASTA 5122 zeichnet sich also vor diesem durch eine größere Stabilität in wässriger Lösung aus. Dabei ist natürlich zu berücksichtigen, daß beim Cyclophosphamid zwei Äquivalente, bei ASTA 5122 nur ein Äquivalent Chlorid pro Mol abspaltbar sind. Die aktuelle alkylierende Potenz von ASTA 5122 - mit dem NBP-Test bestimmt - liegt etwas höher als bei Cyclophosphamid.

> Unter den Standardbedingungen des Tests mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin (NBP) ist bei Cyclophosphamid eine geringe Aktivität von etwa 2 bis 3 mol%, bei ASTA 5122 dagegen von rund 8 mol% nachweisbar.

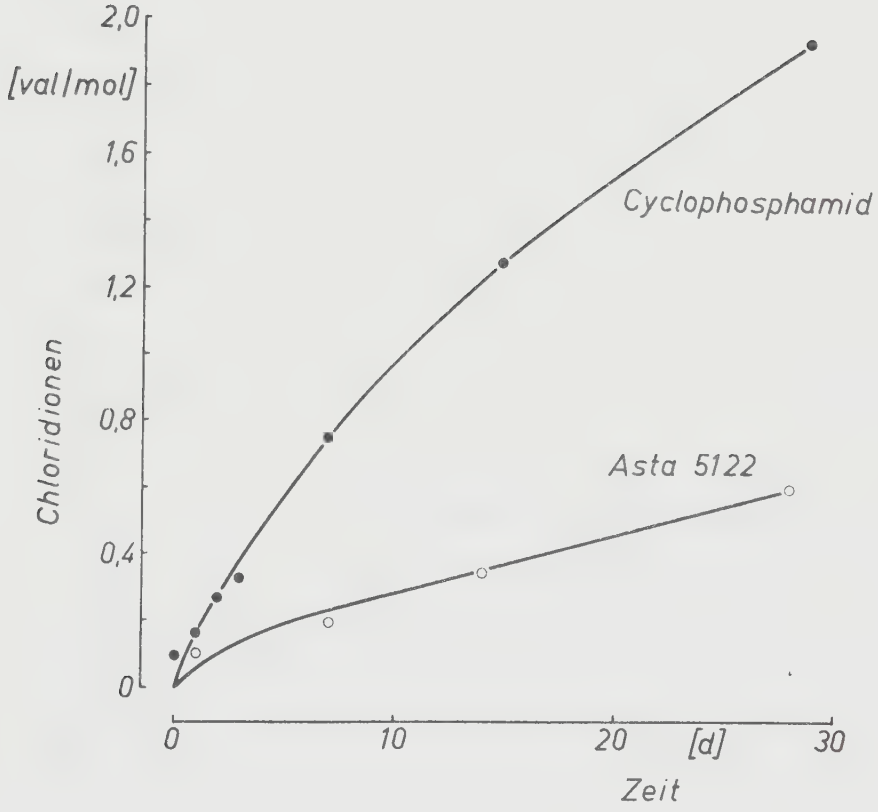


Abb. 18 Chlorid-Ionen-Freisetzung aus ASTA 5122 im Vergleich zu Cyclophosphamid in Bicarbonat-Pufferlösung (pH 7,5; 0,026 mol; 37° C).
Die Konzentration der Präparate betrug 0,02 mol.

8.22 Zytotoxische Aktivität in vitro

Für die Beurteilung der aktuellen zytotoxischen Potenz einer alkylierenden Verbindung hat sich der Inkubationsversuch von SCHMÄHL und DRUCKREY [57] in besonderem Maße bewährt. In diesem Test werden die Krebszellen in vitro mit steigenden Konzentrationen der Prüfsubstanz inkubiert. Nach Auswaschen der Verbindung wird die Transplantabilität auf unbehandelte Versuchstiere getestet. Durch Bestimmung der EC 50* erhält man eine quantitative Aussage über die aktuelle zytostatische Aktivität einer Verbindung.

Entsprechend der geringen chemischen Reaktivität als "Transportform" besitzt ASTA 5122 auch nur eine geringe biologische Aktivität in vitro. Die gegenüber den eingesetzten Zellen des Yoshida-Ascites-Sarkoms (Tokio) zytotoxisch wirksame Konzentration liegt oberhalb einer Konzentration von 1000 µg/ml. Wie bei Cyclophosphamid ist die Konzentration für die Wirkung in vitro drei bis vier Größenordnungen höher als die der aktiven N-Lost-Verbindungen (Tab. 9).

Biologischer Test und Prüfung der chemischen Aktivität ergeben also übereinstimmend, daß ASTA 5122 in vitro praktisch inaktiv ist und als "Transportform" einer metabolischen Aktivierung bedarf.

---

*Die EC 50 (mittlere wirksame Konzentration) einer Verbindung ist hier definiert als die Konzentration, die nach Transplantation der vorbehandelten Tumorzellen das Angehen eines Tumors bei der Hälfte der Tiere verhindert.

Tabelle 9 Zytotoxische Konzentrationen von ASTA 5122 im Vergleich zu Cyclophosphamid sowie verschiedenen N-Lost-Derivaten hoher Reaktivität bei Inkubation mit Yoshida-Ascites-Krebszellen in vitro

Substanz	Yoshida-Ascites-Sarkom (Tokio) (37° C, 1 h) EC 50 µg/ml
ASTA 5122	>1000
Cyclophosphamid	>1000
NH-Lost	2,0
N-Oxyd-Lost	1,0
N-Methyl-Lost	0,2

8.23 Chemotherapeutische Aktivität in vivo

Ziel dieser Untersuchungen ist es, die im Screening gegenüber dem chemosensiblen Yoshida-Ascites-Sarkom (Tokio) nachgewiesene Wirksamkeit auch an Tumorarten höherer Chemoresistenz, unter anderem auch an einer experimentellen Leukämie, zu bestätigen. Für diesen Zweck standen im Pharmakologischen Laboratorium der Asta-Werke mehrere in ihren biologischen und pharmakologischen Eigenschaften wohl bekannte Tumorarten von Ratte und Maus zur Verfügung.

8.231 Chemotherapieversuch am Yoshida-Ascites-Sarkom (Asta)

Im Vergleich zu dem im Screening eingesetzten chemosensiblen Yoshida-Sarkom (Tokio) war das über mehr als 15 Jahre in den Asta-Laboratorien weitergezüchtete Yoshida-Ascites-Sarkom (Asta) rund 30fach resistenter als der 1968 aus Tokio bezogene Tumor. Dies geht aus einer Resistenzbestimmung hervor, die ich zu Beginn meiner Arbeit (1969) durchführte (Tab. 10).

Tabelle 10 Mittlere zytotoxische Konzentration (EC 50) von N-Oxyd-Lost, ermittelt an Zellen zweier Stämme des Yoshida-Ascites-Sarkoms unterschiedlicher Chemoresistenz (Stamm Tokio und Stamm Asta).
Inkubationsversuch (37° C, 1 h)

Substanz	Yoshida-Ascites-Sarkom	
	Stamm Tokio EC 50 [µg/kg]	Stamm Asta EC 50 [µg/kg]
N-Oxyd-Lost	1,0	30,0

In Übereinstimmung mit dem Ergebnis des Inkubationsversuches war der Stamm Asta auch in vivo gegenüber den meisten alkylierenden Zytostatika so resistent, daß an diesem Tumorstamm keine Heilungen, sondern nur vorübergehende Wachstumshemmungen zu erzielen waren. Cyclophosphamid war kurativ wirksam; mit einem Wert von 60 mg/kg (was etwa 32 T.E. entspricht) lag allerdings die DC 50 sehr hoch. In den Testversuchen mit ASTA 5122 wurde daher als Kriterium der "kurativen" Wirksamkeit nicht die Heilung, sondern die mittlere Überlebenszeit bei einmaliger iv.-Gabe der Substanz bestimmt und im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe bewertet. Hinsichtlich des methodischen Vorgehens folgte ich den Angaben der "protocols for screening chemical agents " des Cancer Chemotherapy National Service Center [21]. Im übrigen entsprach das methodische Vorgehen den früher geschilderten Verfahren (Seite 38).

Die Ergebnisse des Therapieversuchs sind aus Tab. 11 zu entnehmen.

Tabelle 11 Mittlere Überlebenszeit von Ratten mit resistentem Yoshida-Ascites-Sarkom (Stamm Asta) unter der Behandlung mit ASTA 5122 und Cyclophosphamid.
Therapiebeginn am Tage der Impfung;
Applikation 1 x intravenös
T.E. = Therapeutische Einheiten ≙ % DL 50
[vergl. 27]
Auswertung nach CCNSC protocols [21]

Substanz	Dosis mg/kg	T.E.	Mittlere Überlebenszeit [d] Kontroll-gruppe	Prüf-gruppe	Anstieg über Kontrollgr. [%]	DL 50 mg/kg
Cyclo-phosphamid	10	5,1	4	7,5	87	196
	20	10,2		11,5	160	
	40	20,4		>48	>1200	
	80	40,8		>48	6/6 geheilt	
ASTA 5122	12,5	7,2	3	4,5	50	174
	25	14,4		4,5	50	
	50	28,7		8,0	166	
	100	57,5		21,0	700	

Im Gegensatz zu den meisten Alkylantien hoher Reaktivität waren mit Cyclophosphamid auch an dieser Tumorart echte Heilungen zu erzielen. Die erforderlichen Dosen waren aber im Vergleich zum chemosensiblen Yoshida-Sarkom (Tokio) rund 30fach höher (80 mg/kg). Die in vitro- und in vivo-Ergebnisse stehen damit in gutem Einklang. ASTA 5122 war ebenfalls wirksam, jedoch eindeutig schwächer als Cyclophosphamid. Eine Dosis von 50 mg/kg verlängerte die Überlebenszeit um 166 %, eine Dosis von 100 mg/kg um 700 %. Echte Heilungen waren aber auch bei dieser toxischen Grenzdosis nicht zu beobachten.

8.232 Chemotherapieversuch an der Leukämie L1210 der Maus

Bei der Leukämie L1210 handelt es sich um eine lymphatische Leukämie, die 1948 an der Maus (Stamm DBA/2) nach Behandlung mit 20-Methylcholanthren erstmalig beobachtet wurde [28]. Diese Tumorart gehört neben dem Carcinosarkom 256 Walker, dem Adenocarcinom 755 und der Dunning-Leukämie zu den Standardtumoren des National Cancer Institute, Bethesda, und spielt damit im Screeningprogramm dieses bedeutsamen Forschungszentrums eine große Rolle [35].

Im Chemotherapieversuch wird zumeist eine tägliche Applikation der Prüfsubstanz bevorzugt, da die therapeutischen Ergebnisse bei wiederholter Gabe besser als bei einmaliger sind. Derartige Versuche mit ASTA 5122 laufen zur Zeit in den Pharmakologischen Laboratorien der Asta-Werke. Im folgenden soll über die Ergebnisse einer ersten Versuchsserie berichtet werden, in der die Versuchssubstanzen 24 h nach der Transplantation der Leukämiezellen einmalig iv. appliziert wurden.

In den vorausgegangenen Letalitätsversuchen (vergl. Tab. 14) hatte sich gezeigt, daß ASTA 5122 im Gegensatz zu Cyclophosphamid an der Maus toxischer ist als an der Ratte und daß die männlichen Tiere empfindlicher als die weiblichen sind. Aus diesem Grunde wurden die Chemotherapieversuche mit ASTA 5122 sowohl an männlichen als auch an weiblichen Tieren durchgeführt.

8.2321 Versuchstechnik

Für die Versuche mit der Leukämie L1210 standen uns Mäuse des Stammes DBA (Züchter: C.W. Friis, Ry/Dänemark) zur Verfügung. Durch intraperitoneale Verimpfung einer Milzsuspension wurde der Tumor in die Scitesform überführt und so fortlaufend weitergezüchtet. Zu diesem Zweck wurde der hämorrhagische Ascites (Zellgehalt 10^5 Zellen/µl) dem getöteten Tier mit einer Spritze steril aus dem Peritonealraum entnommen, mit Tyrode-Lösung 1 : 100 verdünnt und in

einer Menge von 0,2 ml der Verdünnung an Tiere des gleichen Stammes (Gewicht 18 - 20 g) intraperitoneal verimpft. Die Angehrate unserer Versuche betrug 100 %, die mittlere Absterbezeit unbehandelter Kontrolltiere zwischen 8 - 11 Tage. Die Zeit bis zur Transplantationsreife betrug 7 - 8 Tage; zu diesem Zeitpunkt lagen die Leukozytenwerte im Blut zwischen 5×10^4 und $1{,}5 \times 10^5$ Zellen/µl.

8.2322 Ergebnisse

Die Ergebnisse des Therapieversuchs sind aus Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12 Mittlere Überlebenszeit von Mäusen mit Leukämie L1210 (Ascites) nach Applikation von ASTA 5122 und Cyclophosphamid. Therapiebeginn 1 Tag nach der Impfung; Applikation 1 x intraperitoneal. T.E. = Therapeutische Einheiten ≙ % DL 50 [27] Auswertung nach CCNSC protocols [21]

Substanz	Dosis mg/kg	T.E.	Mittlere Überlebenszeit [d] Kontroll-gruppe	Prüf-gruppe	Anstieg über Kontrollgr. [%]	DL 50 mg/kg
Cyclophosphamid(♂)	46,4	10,3	7,8	10	28	450
	68,1	14,7		12	53	
	100	22,2		14	79	
ASTA 5122 (♂)	31,6	36,7	9	12	33	86
	46,4	54,0		14	55	
	68,1	79,2		14	55	
ASTA 5122 (♀)	46,4	36,2	8	12,5	56	128
	68,1	53,2		14,5	81	
	100	78,0		16,0	100	

ASTA 5122 führte unter den gewählten Versuchsbedingungen dosisabhängig zu einer Verlängerung der mittleren Überlebenszeit, die, bezogen auf die gleiche Dosis, etwas größer ist als bei Cyclophosphamid. Für den gleichen therapeutischen Effekt werden allerdings von Cyclophosphamid weniger Therapeutische Einheiten benötigt als von ASTA 5122. An dieser Tumorart sind aber weitere Untersuchungen unter optimierten Versuchsbedingungen, d.h. bei wiederholter Gabe der Prüfsubstanz, erforderlich.

Die Chemotherapieversuche mit ASTA 5122 werden zur Zeit im Pharmakologischen Laboratorium der Asta-Werke an einem größeren Spektrum von Transplantationstumoren von Ratte und Maus fortgesetzt. Sie sollen das pharmakologische Wirkungsbild ergänzen und einen umfassenderen Vergleich mit den Standardsubstanzen ermöglichen.

8.24 Leukotoxische Wirkung

Von besonderer Bedeutung für die Klinik ist die leukotoxische Wirkung eines Zytostatikums. Zu diesem Zweck wurden für ASTA 5122 und Cyclophosphamid der D 50-Index aus der DC 50 (Yoshida-Ascites-Sarkom Tokio) und der DE 50 (ermittelt aus der leukotoxischen Wirkungsgeraden [8]) berechnet. Darüber hinaus wurde aus den beiden Wirkungsgeraden auch der leukotoxische Gefahrenkoeffizient für die DC 84 und die DC 95 bestimmt.

Tab. 13 Leukotoxische Wirkung von ASTA 5122 u.Cyclophosphamid. Beziehung zwischen kurativer Wirkung (DC) am Yoshida-Ascites-Sarkom (Tokio) und leukotoxischer Wirkung (DE) nach einmaliger intravenöser Applikation an Ratten. G = Gefahrenkoeffizient ≙ Belastung kurativer Dosen mit leukotoxischer Wirkungswahrscheinlichkeit

Substanz	DC 50 [mg/kg]	DE 50 [mg/kg]	$\frac{DE\ 50}{DC\ 50}$	$G_{DC\ 84}$ [%]	$G_{DC\ 95}$ [%]
Cyclophosphamid	2,5	23	9,2	<0,02	<0,02
ASTA 5122	5,0	27	5,4	0,03	0,3

8.25 Akute Toxizitätsbestimmung

Bei der Toxizitätsbestimmung alkylierender Substanzen spielen der Zustand der Tiere sowie die Milieubedingungen eine besondere Rolle. Die in den ersten 14 Tagen nach der Applikation sich entwickelnde Phase der Immunsuppression begünstigt die Manifestation latenter Infektionen und beeinflußt somit die Toxizitätswerte. Aus diesem Grunde führten wir die erforderlichen Letalitätsbestimmungen (Maus und Ratte) an SPF-Tieren durch.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Die Daten der Tabelle 14 sind unter verschiedenen Gesichtspunkten von Interesse:

a) An der Ratte ist ASTA 5122, unabhängig von der Applikationsart, mäßig toxischer als Cyclophosphamid.
b) In den Letalitätsversuchen mit ASTA 5122 tritt eine deutliche Geschlechtsspezifität zutage: Männliche Tiere sind empfindlicher als weibliche.
c) An der Maus ist die Toxizität von ASTA 5122 höher als an der Ratte. Umgekehrt ist dagegen die Maus gegenüber Cyclophosphamid meist empfindlicher als die Ratte.
d) Die Unterschiede in den DL 50-Werten für die einzelnen Applikationsarten sind bei beiden Prüfsubstanzen relativ gering; die Substanzen werden also unabhängig von der Applikationsart gut resorbiert.

Das Vergiftungsbild zeigt die für alkylierende Substanzen typischen Erscheinungen [56]; ebenso zeigten die Absterbezeiten mit einer Häufung der Todesfälle zwischen dem 5. und 9. Tag nach der Applikation den für N-Lost-Verbindungen charakteristischen Ablauf. Die toxikologischen Untersuchungen werden z.Zt. im Pharmakologischen Laboratorium der Asta-Werke mit der Bestimmung der Kumulation von ASTA 5122 fortgesetzt. Dabei werden die kumulativen Eigenschaften für die wichtigsten chemotherapeutischen und toxischen Wirkkomponenten durch Bestimmung des an einem Tage reversiblen Anteils [26] quantitativ erfaßt.

Tabelle 14 DL 50-Werte von ASTA 5122 und Cyclophosphamid an Maus und Ratte unter verschiedenen Applikationsbedingungen; Vertrauensgrenzen für p = 5 %
Maus: Stamm CF_1, Gewicht 20 - 25 g
Ratte: Stamm Sprague-Dawley, Gewicht 130 - 180 g
Injektionsdauer: 1 min
Beobachtungszeitraum: 14 d

Substanz	Tierart	DL 50 [mg/kg]			
		iv.	ip.	sc.	per os
ASTA 5122	Maus ♀	116 (95-140)	128 (119-139)	110 (104-118)	103 (95-113)
	Maus ♂	91 (84-96)	86 (79-95)	82 (68-96)	69 (58-78)
	Ratte ♀	174 (160-187)	245 (213-275)	251 (233-280)	207 (189-228)
	Ratte ♂	102 (91-114)	120 (111-130	115 (103-129)	107 (101-115)
Cyclo-phospha-mid	Maus ♀	417 (371-476)	460 (441-476)	529 (470-599)	592 (566-637)
	Maus ♂	389 (358-405)	443 (376-472)	-	585 (560-615)
	Ratte ♀	196 (152-253)	-	-	-
	Ratte ♂	178 (146-202)	-	-	-

8.26 Immunsuppressive Wirksamkeit

Besonders interessante Ergebnisse erbrachten neuere Untersuchungen von POTEL und BROCK [50] zur Frage der Immunsuppression mit ASTA 5122. Durch mehrfache Gabe immunogener Antigendosen (25000 Schaferythrozyten/mm^3) in fünftägigen Abständen an Mäusen bei gleichzeitiger Gabe von ASTA 5122 war es nicht nur möglich, die Bildung von Hämagglutininen und Hämolysinen zu unterdrücken, sondern eine Immuntoleranz, ermittelt am Fehlen humoraler Antikörper, nach einer später durchgeführten homologen Verstärkungsimmunisierung zu erzeugen.

8.27 Wirkmechanismus

Die vorliegenden Befunde zeigen, daß ASTA 5122 chemisch und biologisch weitgehend inaktiv ist, im Warmblüterorganismus aber eine starke pharmakologische Wirksamkeit entfaltet. ASTA 5122 gleicht damit in seinem Reaktionstyp dem Cyclophosphamid. Von diesem Präparat ist bekannt, daß es in der Leber von Warmblütern durch ein mikrosomales Enzymsystem unter Verbrauch von Sauerstoff und reduziertem Nicotinamid-adenindinucleotid-phosphat ($NADPH_2$) aktiviert wird [15, 16, 17]. Nach Applikation von Cyclophosphamid treten im Blutserum Verbindungen auf, die sich von Cyclophosphamid selbst durch ihre zytostatische Aktivität gegen isolierte Ascites-Krebszellen im Inkubationstest und durch spontane Alkylierung von 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin (NBP) unterscheiden und getrennt bestimmen lassen. Mit Hilfe des NBP-Testes versuchte ich, auch für ASTA 5122 die Menge bzw. die Konzentration der im Organismus entstehenden zytostatisch aktiven Umwandlungsprodukte nachzuweisen.

Männlichen sowie weiblichen Ratten wurde eine Dosis von 62,5 mg/kg ≙ 0,195 mmol/kg ASTA 5122 ip. verabfolgt und die alkylierende Aktivität im Blutserum zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion mit der NBP-Reaktion bestimmt ("direkte NBP-Aktivität").

Zum Vergleich wurde eine entsprechende Aktivitätskurve von Cyclophosphamid herangezogen.

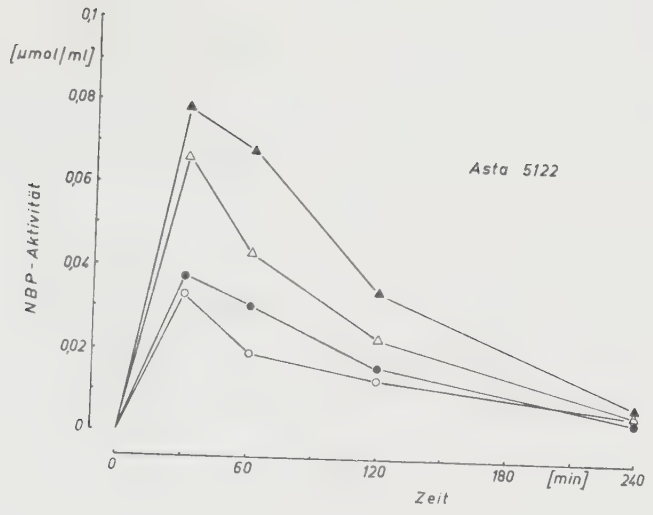
Abb. 19 zeigt den Kurvenverlauf. Bei beiden Präparaten ist das Maximum der NBP-Aktivität im Serum bereits nach 30 min erreicht. Bezogen auf eine gleiche Dosierung ist die Konzentration direkt alkylierender Metaboliten nach ASTA 5122 zu diesem Zeitpunkt etwa halb so hoch wie nach Cyclophosphamid.

Aus dem Vergleich der Maximalwerte sowie der Flächenwerte der NBP-Aktivitätskurven im Blutserum wird deutlich, daß die Aktivierung von ASTA 5122 bei männlichen Tieren stärker ist als bei weiblichen. So beträgt der Maximalwert im Blutserum nach Gabe von 125 mg/kg ASTA 5122 bei männlichen Tieren 0,078 µmol/ml, bei weiblichen Tieren 0,066 µmol/ml. Der Flächenwert der Aktivitätskurve nach der Zeit liegt bei männlichen Tieren bei 5940 mm^2, bei weiblichen Tieren bei 4230 mm^2. Diese Unterschiede in der Aktivitätsrate sind so beträchtlich, daß hierdurch die unterschiedlichen Toxizitätswerte erklärt werden können.

Ob die primär gegenüber Cyclophosphamid geringere Aktivierungsrate von ASTA 5122 durch eine geringere Aktivität der Mikrosomenenzyme gegenüber dieser Verbindung bedingt ist, muß ein Versuch mit isolierten Mikrosomen entscheiden.

8.28 Diskussion

Pharmakologische Untersuchungen bestätigen in verschiedenen Versuchsanordnungen, daß ASTA 5122, ein gemischt funktionelles Oxazaphosphorin-2-oxid, ein interessantes Wirkungsspektrum besitzt. Die Verbindung leitet sich strukturell vom Ifosfamid ab und behält auch trotz des Ersatzes der extrazyklischen 2-Chloräthylgruppe durch die 2-Mesyloxyäthyl-Gruppe den N-Lost-Charakter der Grundverbindung bei. Dies gilt sowohl



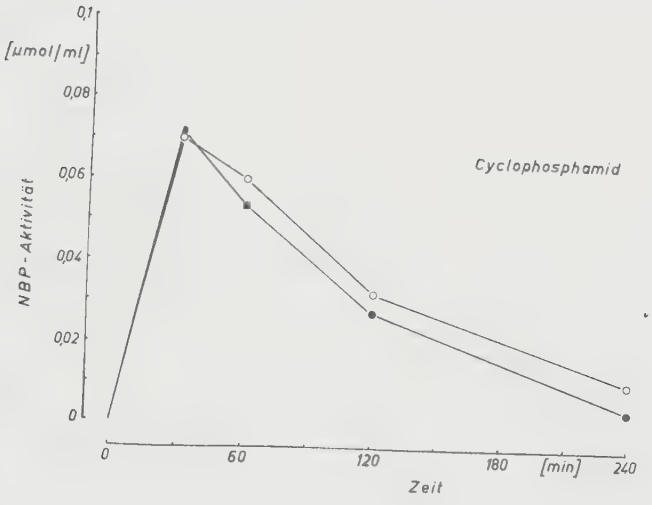


Abb. 19

Spiegel an direkter NBP-Aktivität im Serum von männlichen und weiblichen Ratten nach intraperitonealer Applikation von ASTA 5122 und Cyclophosphamid.

Abszisse: Zeit nach ip. Injektion von ASTA 5122 bzw.Cyclophosphamid

Ordinate: NBP-Aktivität im Blutserum

ASTA 5122: 62,5 mg/kg ≙ 0,195 mmol/kg ●= ♂, ○= ♀
125 mg/kg ≙ 0,390 mmol/kg ▲= ♂, △= ♀

Cyclophosphamid: 62,5 mg/kg ≙ 0,224 mmol/kg ●= ♂, ○= ♀

Bestimmung der direkten NBP-Aktivität im Rattenserum mit Hilfe des NBP-Tests nach Enteiweißung bei 3° C

für die Tumorwirksamkeit als auch für die leukozytäre Reaktion, die der des Stickstofflosts und nicht der des Busulfans entspricht. ASTA 5122 stellt, wie Ifosfamid und Cyclophosphamid, eine inaktive Transportform dar,aus der erst im Organismus die eigentliche Wirkform entsteht.

Aufgrund des Wirkungsspektrums erscheint eine eingehendere Charakterisierung und gegebenenfalls eine klinische Prüfung von ASTA 5122 weniger bei soliden Tumoren als bei Hämoblastosen, insbesondere den verschiedenen Leukämieformen, angezeigt.

Die immunsuppressive Wirksamkeit legt eine klinische Prüfung bei Autoaggressionskrankheiten sowie der Organtransplantation nahe. Die im Tierversuch beobachtete Immuntoleranz würde, falls sie sich am Menschen bestätigte, hier besondere therapeutische Möglichkeiten erschließen.

9. Zusammenfassung

Ausgehend von pharmakologischen Wirkungsunterschieden in der Gruppe alkylierender Zytostatika, speziell zwischen den 2-Chloräthyl- und den Mesyloxyalkyl-Verbindungen, wurde versucht, die 2-Chloräthyl-Gruppe in den Präparaten Cyclophosphamid, Trofosfamid und Ifosfamid ganz oder teilweise durch die 2-Mesyloxyäthyl-, oder allgemeiner, durch die Alkylsulfonyloxyalkyl-Gruppe zu ersetzen.

1. Sämtliche Verbindungen wurden einem pharmakologischen Screening unterworfen, wobei an Ratten die mittlere kurative Dosis DC 50 an einem chemosensiblen Yoshida-Sarkom (Tokio), die mittlere letale Dosis DL 50 sowie der D 50-Index bestimmt wurden.
2. Darüber hinaus wurde die leukozytäre Reaktion durch quantitative Bestimmung der Gesamt-Leukozyten sowie differenziert auch der Granulozyten und Lymphozyten im 14-Tage-Zeitraum nach Gabe der Prüfsubstanzen erfaßt (N-Lost- bzw. Busulfan-Typ nach ELSON [31]).

3. Die chemotherapeutisch interessantesten Verbindungen leiten sich von Ifosfamid ab, und zwar durch Austausch der extrazyklischen 2-Chloräthyl-Gruppe. Am günstigsten sind Derivate, die extrazyklisch die Methylsulfonyloxyäthyl-Gruppe (Nr. 5122), die Äthylsulfonyloxyäthyl-Gruppe (Nr. 5607) sowie die Methylsulfonyloxyisopropyl-Gruppe (Nr. 5841) und die Methylsulfonyloxyisobutyl-Gruppe (Nr. 5840) enthalten.

4. In ihrer leukozytären Reaktion sind die gemischt funktionellen Derivate des Ifosfamids nicht einheitlich. Die Verbindungen 5122, 5607, 5764, 5840 und 5841 folgen dem N-Lost-Typ, die Verbindungen 5772, 5783, 5773 entsprechen dem Busulfan-Typ.
5. Verbindung ASTA 5122 wurde pharmakologisch näher charakterisiert. Die chemische Reaktivität der Verbindung in wässriger Lösung ist, gemessen an der Geschwindigkeit der Chloridionen-Freisetzung sowie im Test mit 4-(4-Nitrobenzyl)-pyridin (NBP) gering. In Übereinstimmung damit ist ASTA 5122 in vitro auch biologisch weitgehend inaktiv ("Transportform").
6. Im Chemotherapieversuch in vivo erwies sich ASTA 5122 bei relativ guter Verträglichkeit gegenüber verschiedenen Stämmen des Yoshida-Ascites-Sarkoms der Ratte als wirksam, war kurativ jedoch eindeutig schwächer als Cyclophosphamid. An der Leukämie L1210 der Maus waren beide Substanzen, bezogen auf die gleiche Dosis, annähernd gleich wirksam ("Wirkform").
7. Die leukotoxische Wirkung von ASTA 5122 ist stärker als die von Cyclophosphamid.
8. ASTA 5122 verfügt über eine starke immunsuppressive Wirkkomponente und übertrifft hierin Cyclophosphamid und Ifosfamid eindeutig.
9. Auf Grund des pharmakologischen Wirkungsbildes ist eine klinische Prüfung bei Hämoblastosen (Leukämien) sowie bei Autoaggressionskrankheiten und bei der Organtransplantation angezeigt.

10. Verzeichnis der Generic Names, chemischen Bezeichnungen, Handelsnamen und Hersteller der in dieser Arbeit erwähnten Zytostatika (vergl. vornehmlich Abbildung 1)

Chlormethin

Chem.Bez.: N,N-Bis-(2-chlor-aethyl)-N-methyl-amin

Handelsname, Firma: Caryolysine (Delagrange, Fr.)
Cloramin (Simes, It.)
Mustargen (Merck, Sharp + Dohme)

Mechlorethaminoxid

Chem.Bez.: N,N-Bis-(2-chlor-aethyl)-N-methyl-amin-N-oxid

Handelsname, Firma: Mitomen® (Asta)
Nitromin® (Takeda, Jap.).

Mannomustin

Chem.Bez.: 1,6-Bis[(2-Chlor-aethyl)-amino]-1,6-dideoxy-D-mannit

Handelsname, Firma: Degranol (Chinion, Ung.)
Mannomustin "Lentia" (Lentia)

Chlorambucil

Chem.Bez.: 4-(p-[N,N-Bis-(2-chlor-aethyl)-amino]-phenyl)-buttersäure

Handelsname, Firma: Leukeran® (Burroughs Wellcome,USA)
(Dtsch.Wellcome)

Melphalan

Chem.Bez.: p-[Bis-(2-chlor-aethyl)-amino]-L-phenylalanin

Handelsname, Firma: Alkeran® (Burroughs Wellcome,USA)
(Dtsch.Wellcome)

Sarcolysin

Chem.Bez.: DL-p-[Bis-(2-chlor-aethyl)-amino]-phenyl-alanin

Handelsname, Firma: Sarcoclorin (Simes, It.)

Cyclophosphamid

Chem.Bez.: 2-[Bis-(2-chlor-aethyl)-amino]-perhydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid

Handelsname, Firma: Endoxan® (Asta)

Ifosfamid

Chem.Bez.: 3-(2-Chloräthyl)-2-(2-chloräthylamino)-perhydro-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid

Firma: (Asta)

Trofosfamid

Chem.Bez.: 3-(2-Chloräthyl)-2-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-perhydro-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid

Firma: (Asta)

Tretamin

Chem.Bez.: 2,4,6-Tri-(aziridin-1-yl)-1,3,5-triazin

Handelsname, Firma: TEM "Lederle" (Lederle)

Thiotepa

Chem.Bez.: Tris-(aziridin-1-yl)-phosphinsulfid

Handelsname, Firma: Thio-Tepa (Lederle)
Tifosyl (Astra, Schwed.)

Inproquon

Chem.Bez.: 2,5-Di-(aziridin-1-yl)-3,6-dipropoxy-1,4-benzochinon

Handelsname, Firma: Bayer E 39 (Bayer)

Triaziquon

Chem.Bez.: Tri-(aziridin-1-yl)-p-benzochinon

Handelsname, Firma: Trenimon® (Bayer)

Busulfan

Chem.Bez.: Tetramethylen-bis-(methansulfonat)

Handelsname, Firma: Myleran® (Burroughs Wellcome, BRD)
Mielucin (Simes, It.)

Aminopterin-Natrium

Chem.Bez.: N-[4-(2,3-Diamino-pteridin-6-yl-methylamino)-benzoyl]-L-(+)-glutaminsäure, Na-Salz

Handelsname, Firma: Aminopterin "Lederle" (Lederle)
nicht mehr im Handel

Methotrexat

Chem.Bez.: N-(p-[N-(2,4-Diamino-pteridin-6-yl-methyl)-methylamino]-benzoyl-L-(+)-glutaminsäure

Handelsname, Firma: Methotrexat "Lederle" (Lederle)

Mercaptopurin

Chem.Bez.: Purin-6-thiol

Handelsname, Firma: Purinethol® (Burroughs Wellcome, Engl.)
Puri-nethol® (Dtsch.Wellcome)

8-Azaguanin

Chem.Bez.: 5-Amino-1H-vic.triazolo-(d)-pyrimidin-7-ol

Firma: (Lederle, USA)

Fluoruracil

Chem.Bez.: 5-Fluor-uracil

Handelsname, Firma: Fluoro-uracil "Roche" (Hoffmann-La Roche)

Cytarabin

Chem.Bez.: 4-Amino-1-arabinofuranosyl-2-oxo-1,2-dihydro-pyrimidin

Handelsname, Firma: Alexan® (Mack)
Cytosar® (Upjohn, USA)

Azaserin

Chem.Bez.: O-Diazoacetyl-L-serin

Handelsname, Firma: Azaserine (Parke Davis, USA)

Mitobronitol

Chem.Bez.: 1,6-Dibrom-1,6-didesoxy-D-mannit

Handelsname, Firma: Myelobromol® (Chinoin, Ung.)
(Lentia)

DON

Chem.Bez.: 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin

Firma: (Parke Davis, USA)

Procarbazin

Chem.Bez.: N-Isopropyl-p-(2-methyl-hydrazino-methyl)-benzamid

Handelsname, Firma: Natulan® (Hoffmann-La Roche)

Hydroxycarbamid

Chem.Bez.: N-Hydroxyharnstoff

Handelsname, Firma: Hydrea® (Squibb, USA)
Litalir® (Heyden)

Carmustine(BCNU)

Chem.Bez.: 1,3-Bis-(2-chloräthyl)-1-nitrosoharnstoff

Firma: (Pfizer, USA)

Cactinomycin

Chem.Bez.: Actinomycin C

Handelsname, Firma: Sanamycin (Bayer)
nicht mehr im Handel

Dactinomycin

Chem.Bez.: Actinomycin D

Handelsname, Firma Cosmegen (Merck Sharp + Dohme, USA)
Lyovac-Cosmegen (Sharp + Dohme)

Carzinophilin

Handelsname, Firma: Carzinophylin (Kyowa, Jap.)

Mitomycin® C (Handelsname)

Firma: (Kyowa, Jap.)

Bleomycin

Handelsname, Firma: Bleomycin (Nippon Kayaku,Jap.)

Daunorubicin

Handelsname, Firma: Daunoblastin® (Farmitalia, BRD)
Ondena® (Bayer)
Cerubidin® (May + Baker, GB)

Colchicin

Handelsname, Firma: Colchicine Houde (Houde, Fr.)

Demecolcin

Chem.Bez.: N-Desacetyl-N-methyl-colchicin

Handelsname, Firma: Colcemide® (Ciba)
nicht mehr im Handel

Mitopodozid

Chem.Bez.: 2-Aethyl-hydrazid der Podophyllinsäure

Handelsname, Firma: Proresid® Amp. (Sandoz)

(SP-G)

Chem.Bez.: benzylidenierte Glukoside aus Podophyllum emodi

Handelsname, Firma: Proresid® Kaps.u.Tropf. (Sandoz)

Vincristin

Chem.Bez.: Alkaloid aus Vinca rosea

Handelsname, Firma: Oncovin (Lilly, Engl.)
(Schweizer Serum- u. Impfinstitut, Schweiz)
Vincristin "Lilly" (Lilly, BRD)

Vinblastin

Chem.Bez.: Alkaloid aus Vinca rosea (Vincaleukoblastin)

Handelsname, Firma: Velban (Lilly, USA)
Velbe® (Lilly, BRD, Fr.)

Asparaginase

Chem.Bez.: L-Asparagin-amidohydrolase

Handelsname, Firma: Crasnitin® (Bayer, BRD; May + Baker, GB)

Compd. 838

Chem.Bez.: 3,3'-Methylimino-di-1-propanol-dimethansulfonat

Firma: (Sakurai, Jap.)

Am Schlusse meiner Arbeit spreche ich Herrn Professor Dr. Brock für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Anregungen bei deren Anfertigung meinen besonderen Dank aus.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Herken für die Übernahme des Referates und Herrn Prof. Dr. Neubert für die Übernahme des Korreferates.

Für ihre Hilfe bei der technischen Durchführung der Tierversuche und der Auswertung und Aufarbeitung der Versuchsergebnisse danke ich den Mitarbeiterinnen in den Pharmakologischen Laboratorien der Asta-Werke, Frau Barbara Dornau, Fräulein Jutta Dost, Fräulein Jutta Kottmeier, Frau Renate Langer, Frau Monika Twellmann und Fräulein Margrit Wilmanns.

Lebenslauf

Ich wurde am 10. 12. 1944 als 2. Kind des Herrn Dr.med. Karl Kuhlmann und seiner Ehefrau Agnes geb. Brock in Wadersloh geboren. Im Frühjahr 1964 bestand ich am Staatlichen Gymnasium in Warendorf die Reifeprüfung und begann im Sommersemester 1964 an der Freien Universität Berlin das Medizinstudium.

Das 2. und 3. klinische Semester studierte ich in Münster und Wien. Anschließend ging ich wieder nach Berlin, wo ich im August 1970 das medizinische Staatsexamen erfolgreich bestand.

Den größten Teil während der Semesterferien im klinischen Studium und des Studiensemesters in Münster verbrachte ich mit der Arbeit an dem experimentellen Teil meiner Doktorarbeit bei den Asta-Werken in Brackwede unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Brock.

Am 15. 10. 1970 begann meine Tätigkeit als Medizinalassistent. Zunächst arbeitete ich je 2 Monate an der Universitätsfrauenklinik und der Universitätskinderklinik in Berlin. Anschließend war ich 4 Monate an der Unfallchirurgischen Klinik in Braunschweig tätig. Seit Juli 1971 bin ich mit der Auswertung des experimentellen Teils meiner Doktorarbeit und ihrer schriftlichen Fixierung beschäftigt, die ich nun beendet habe. Seit dem 1. 8. 1971 bin ich auf der Inneren Abteilung des St. Franziskus-Hospitals in Bielefeld als Medizinalassistent tätig und werde Ende November die Approbation beantragen.